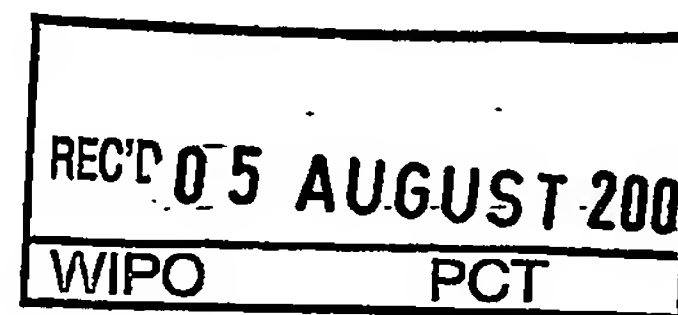


EP0418470

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 10 2004 029 639.1

**Anmeldetag:** 18. Juni 2004

**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG, 40474 Düsseldorf/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zur Herstellung von L-Threonin

**Priorität:** 12. August 2003 DE 103 37 028.5

**IPC:** C 12 N 1/00

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 19. Juli 2004  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

Letang

AVAILABLE COPY

### Verfahren zur Herstellung von L-Threonin

Gegenstand der Erfindung ist ein verbessertes Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin unter Verwendung von Bakterien der Familie Enterobacteriaceae.

#### 5 Stand der Technik

L-Threonin findet in der Humanmedizin, in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, dass L-Threonin durch Fermentation von  
10 Stämmen der Familie der Enterobacteriaceae, insbesondere Escherichia coli, hergestellt werden kann. Wegen der großen Bedeutung dieser Aminosäure wird ständig an der Verbesserung der Herstellungsverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische  
15 Maßnahmen, wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie z.B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform, durch z.B. Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen, d.h.  
20 die genetisch bedingten Leistungseigenschaften des Bakteriums selbst betreffen.

US-A-5,538,873 und EP-B-0593792 oder Okamoto et al. (Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 61 (11), 1877 - 1882, 1997) beschreiben, dass Threonin durch  
25 Fermentation im Satzverfahren (batch) oder Zulaufverfahren (fed batch) hergestellt werden kann. Weiterhin ist in US 6,562,601 ein Verfahren zur Herstellung von L-Threonin unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae beschrieben, bei dem nach Durchführung einer Fermentation  
30 im Zulaufverfahren (fed batch) die Fermentationsbrühe auf 1-90 Vol.-% abgelassen wird, anschließend die verbleibende Fermentationsbrühe mit Wachstumsmedium auffüllt und bevorzugt nach einer Wachstumsphase eine weitere

Fermentation nach dem genannten Zulaufverfahren (fed batch) durchführt. Dieses Verfahren kann mehrmals wiederholt werden und heißt daher wiederholtes Zulaufverfahren (repeated fed batch).

- 5 Ein weiteres Verfahren zur Herstellung von Threonin unter Verwendung von Bakterien der Familie Enterobacteriaceae, insbesondere Escherichia coli, ist in der Patentschrift US 6,562,601 beschrieben. Es besteht darin, dass das Bakterium zunächst nach dem Zulaufverfahren kultiviert wird, wobei  
10 sich Threonin in der Fermentationsbrühe anreichert. Zu einem gewünschten Zeitpunkt wird ein Teil, d.h. 10 bis 99% der im Fermenter enthaltenen Fermentationsbrühe geerntet. Der restliche Teil der Fermentationsbrühe verbleibt im Fermenter. Die im Fermentierbehälter verbleibende  
15 Fermentationsbrühe wird mit Nährmedium aufgefüllt und eine weitere Fermentation nach dem Zulaufverfahren durchgeführt. Der beschriebene Zyklus wird gegebenenfalls mehrfach durchgeführt.

#### Aufgabe der Erfindung

- 20 Aufgabe der Erfindung ist es, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L-Threonin bereitzustellen.

#### Beschreibung der Erfindung

- Gegenstand der Erfindung ist ein Fermentationsverfahren,  
25 das dadurch gekennzeichnet ist, dass man

- a) das Bakterium in mindestens einem ersten Nährmedium inokuliert und kultiviert, anschließend  
b) einen Teil der Fermentationsbrühe abtrennt, wobei mehr  
als 90 Vol.-%, insbesondere mehr als 91 Vol.-%, mehr  
30 als 92 Vol.-%, mehr als 93 Vol.-%, mehr als 94 Vol.-%, mehr als 95 Vol.-%, mehr als 96 Vol.-%, mehr als 97 Vol.-% oder mehr als 98 Vol.-% und wobei maximal 99

Vol.-%, 99,3 Vol.-%; 99,6 Vol.-% oder 99,9 Vol.-% des Gesamtvolumens der Fermentationsbrühe im Fermentationsbehälter verbleiben, anschließend

- 5 c) die verbleibende Fermentationsbrühe mit einem oder mehreren weiteren Nährmedien auffüllt, wobei das weitere Nährmedium oder die weiteren Nährmedien mindestens eine Kohlenstoffquelle, mindestens eine Stickstoffquelle und mindestens eine Phosphorquelle enthalten, und die Kultivierung unter Bedingungen die
- 10 die Bildung von L-Threonin erlauben, fortsetzt,
- d) die Schritte b) und c) gegebenenfalls mehrfach durchführt, und
- e) die Konzentration der Kohlenstoffquelle(n) während der Kultivierung gemäß Schritt c) und/oder d) bei maximal
- 15 30 g/l eingestellt wird.

Die Kultivierung des Bakteriums gemäß Schritt a) erfolgt typischerweise in einem Fermenter (Bioreaktor). Diese haben im Maßstab der industriellen Produktion ein Volumen von ca. 10 - 500 m<sup>3</sup> (Kubikmeter). Im Labormaßstab in dem das

20 erfindungsgemäße Verfahren auf einfache Weise geprüft werden kann sind Fermentervolumina von 1 - 50 l typisch. Im halbtechnischen Maßstab sind Fermentervolumina von 50 l bis 10 m<sup>3</sup> gebräuchlich.

Unter dem Begriff Anlagenleistung versteht man, dass in

25 einer Anlage (plant) wie z. B. einem Fermenter die Masse bzw. Menge eines Produktes mit einer bestimmten Ausbeute und mit einer bestimmten Geschwindigkeit bzw. Produktivität oder Raum-Zeit-Ausbeute hergestellt wird. Diese Parameter bestimmen weitgehend die Kosten oder die Wirtschaftlichkeit

30 eines Verfahrens.

Unter einer Fermentationsbrühe versteht man die durch die Kultivierung eines Mikroorganismus - im Falle der vorliegenden Erfindung ein L-Threonin produzierendes

Bakterium - in einem Nährmedium unter Verwendung eines Fermenters entstandene Suspension eines Mikroorganismus.

- Erfindungsgemäß kann die Anlagenleistung einer L-Threonin produzierenden Fermenters dadurch gesteigert werden, dass
- 5 man in dem oben beschriebenen ersten Schritt a) nach dem Satzverfahren (batch) oder Zulaufverfahren (fed batch) kultiviert, wobei bei Verwendung des Zulaufverfahrens mindestens ein Zusatz-Nährmedium eingesetzt wird. In dem beschriebenen Schritt b) wird der Kultur Fermentationsbrühe
- 10 entzogen, wobei weniger als 10 Vol.-%, insbesondere weniger als 9 Vol.-%, weniger als 8 Vol.-%, weniger als 7 Vol.-%, weniger als 6 Vol.-%, weniger als 5 Vol.-%, weniger als 4 Vol.-%, weniger als 3 Vol.-% oder weniger als 2 Vol.-% und wobei als Minimum 1 Vol.-%, 0,7 Vol.-%, 0,4 Vol.-% oder 0,1
- 15 Vol.-% des Gesamtvolumens der Fermentationsbrühe abgetrennt werden. Dementsprechend verbleiben bei dem erfindungsgemäßen Verfahren gemäß Schritt b) mehr als 90 bis maximal 99,9 Vol.-% der Fermentationsbrühe in dem Fermenter.
- 20 Anschließend, im Schritt c) wird die verbleibende Fermentationsbrühe mit einem oder mehreren weiteren Nährmedien bis auf ca. 100 % des ursprünglichen Volumens aufgefüllt, wobei das weitere Nährmedium oder die weiteren Nährmedien mindestens eine Kohlenstoffquelle, mindestens
- 25 eine Stickstoffquelle und mindestens eine Phosphorquelle enthalten, und die Kultivierung unter Bedingungen fortgesetzt, die die Bildung von L-Threonin erlauben. Dieser Schritt c) wird gegebenenfalls mehrfach wiederholt. Das gebildete L-Threonin wird gesammelt und gegebenenfalls
- 30 gereinigt und isoliert.

Während des Kultivierungsschrittes a) wird das Bakterium in mindestens einem ersten Nährmedium inokuliert und nach dem Satzverfahren (batch) oder Zulaufverfahren (fed batch) kultiviert. Bei Verwendung des Zulaufverfahrens wird nach

35 mehr als 0 bis maximal 10 Stunden, vorzugsweise nach 1 bis



10 Stunden, bevorzugt nach 2 bis 10 Stunden und besonders bevorzugt nach 3 bis 7 Stunden ein Zusatz-Nährmedium zugeführt.

Das erste Nährmedium enthält als Kohlenstoffquelle eine  
5 oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse aus Zuckerrüben oder Zuckerrohr, Fruktose, Glukose, Stärkehydrolysat, Laktose, Galaktose, Maltose, Xylose, Cellulosehydrolysat, Arabinose, Essigsäure, Ethanol und Methanol in den Konzentrationen von  
10 1 bis 100 g/kg oder 1 bis 50 g/kg, bevorzugt von 10 bis 45 g/kg, besonders bevorzugt von 20 bis 40 g/kg. Unter Stärkehydrolysat versteht man erfindungsgemäß das Hydrolysat von Stärke aus Mais, Getreide, Kartoffeln oder Tapioka.

15 Als Stickstoffquelle im erste Nährmedium können organische, Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniak, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid,  
20 Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat Kaliumnitrat, Kaliumnatriumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung in den Konzentrationen von 1 bis 40 g/kg, bevorzugt von 1 bis 30 g/kg oder 10 bis 30 g/kg, besonders bevorzugt von 1 bis 25  
25 g/kg oder 10 bis 25 g/kg, ganz besonders bevorzugt 1 bis 30 g/kg oder 1 bis 25 verwendet werden.

Als Phosphorquelle im ersten Nährmedium können Phosphorsäure, Alkali- oder Erdalkalisalze der Phosphorsäure, insbesondere Kaliumdihydrogenphosphat oder  
30 Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze, Polymere der Phosphorsäure oder das Hexaphosphorsäureester des Inosits, auch Phytinsäure genannt, oder deren Alkali- oder Erdalkalisalze in den Konzentrationen von 0,1 bis 5 g/kg, bevorzugt von 0,3 bis 3  
35 g/kg, besonders bevorzugt von 0,5 bis 1,5 g/kg verwendet

werden. Das erste Nährmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Diese Substanzen liegen in den Konzentrationen von 0,003 bis 3 g/kg vor. Schließlich werden essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren (z.B. Homoserin) und Vitamine (z.B. Thiamin) zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden.

- 10 Das Zusatz-Nährmedium, welches in einem Zulaufverfahren (fed batch) angewandt wird, enthält im allgemeinen lediglich als Kohlenstoffquelle eine oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse aus Zuckerrüben oder Zuckerrohr, Fruktose, Glukose, 15 Stärkehydrolysat, Laktose, Galaktose, Maltose, Xylose, Cellulosehydrolysat, Arabinose, Essigsäure, Ethanol und Methanol in den Konzentrationen von 300 bis 700 g/kg, bevorzugt von 400 bis 650 g/kg, und gegebenenfalls eine anorganische Stickstoffquelle wie z.B. Ammoniak, 20 Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat, Ammoniumnitrat, Kaliumnitrat oder Kaliumnatriumnitrat. Alternativ können diese und andere Komponenten auch separat zugefüttert werden.

- Es wurde gefunden, dass bei dem erfindungsgemäßen Verfahren 25 gemäß Schritt c) und/oder d) die Bestandteile des weiteren Nährmediums in Form eines einzigen weiteren Nährmediums sowie in einer Vielzahl von weiteren Nährmedien der Kultur zugeführt werden können. Erfindungsgemäß wird das weitere Nährmedium beziehungsweise werden die weiteren Nährmedien 30 in mindestens einem (1) Zufütterungsstrom oder in einer Vielzahl an Zufütterungsströmen mindestens 2 bis 10, vorzugsweise 2 bis 7 oder 2 bis 5 Zufütterungsströmen der Kultur zugeführt.

- Das weitere Nährmedium bzw. die weiteren Nährmedien 35 enthält/enthalten als Kohlenstoffquelle eine oder mehrere

der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse aus Zuckerrüben oder Zuckerrohr, Fruktose, Glukose, Stärkehydrolysat, Maltose, Xylose, Cellulosehydrolysat, Arabinose, Essigsäure, Ethanol und Methanol in den

5 Konzentrationen von 20 bis 700 g/kg, bevorzugt von 50 bis 650 g/kg.

Weiterhin enthält das weitere Nährmedium bzw. enthalten die weiteren Nährmedien eine Stickstoffquelle bestehend aus organischen, Stickstoff-haltigen Verbindungen wie Peptone,

10 Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniak, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat, Ammoniumnitrat und/oder Kaliumnitrat oder Kaliumnatriumnitrat. Die

15 Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung in den Konzentrationen von 5 bis 50 g/kg, bevorzugt von 10 bis 40 g/kg, verwendet werden.

Weiterhin enthält das weitere Nährmedium bzw. enthalten die weiteren Nährmedien eine Phosphorquelle bestehend aus

20 Phosphorsäure oder den Alkali- oder Erdalkalisalzen der Phosphorsäure, insbesondere Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze, Polymere der Phosphorsäure oder das Hexaphosphorsäureester des Inosits, auch Phytinsäure

25 genannt, bzw. die entsprechenden Alkali- oder Erdalkalisalze. Die Phosphorquellen können einzeln oder als Mischung in den Konzentrationen von 0,3 bis 3 g/kg, bevorzugt von 0,5 bis 2 g/kg verwendet werden. Das weitere Nährmedium bzw. die weiteren Nährmedien muss/müssen

30 weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind, in den Konzentrationen von 0,003 bis 3 g/kg, bevorzugt in den Konzentrationen von 0,008 bis 2 g/kg. Schließlich werden essentielle Wachstumsstoffe wie

35 Aminosäuren (z.B. Homoserin) und Vitamine (z.B. Thiamin)



zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden.

Bei Verwendung eines einzigen weiteren Nährmediums wird  
5 dieses typischerweise in einem Zufütterungsstrom der Kultur  
zugeführt. Bei Verwendung einer Vielzahl weiterer  
Nährmedien werden diese in einer entsprechenden Vielzahl an  
Zufütterungsströmen zugeführt. Bei der Verwendung einer  
Vielzahl weiterer Nährmedien ist zu beachten, dass diese  
10 jeweils nur eine der beschriebenen Kohlenstoff-,  
Stickstoff-, oder Phosphorquellen enthalten können, aber  
auch eine Mischung von den beschriebenen Kohlenstoff-,  
Stickstoff-, oder Phosphorquellen.

Erfindungsgemäß wird das zugeführte weitere Nährmedium oder  
15 die zugeführten weiteren Nährmedien so eingestellt, das ein  
Phosphor zu Kohlenstoffverhältnis (P/C Verhältnis) von  
maximal 4; von maximal 3; von maximal 2; von maximal 1,5;  
von maximal 1; von maximal 0,7; von maximal 0,5; maximal  
0,48; maximal 0,46; maximal 0,44; maximal 0,42; maximal  
20 0,40; maximal 0,38; maximal 0,36; maximal 0,34; maximal  
0,32; maximal 0,30 mmol Phosphor / mol Kohlenstoff besteht.

Das in Schritt b) beschriebene Abtrennen der  
Fermentationsbrühe geschieht in weniger als 180 Minuten,  
vorzugsweise in weniger als 120 Minuten, besonders  
25 bevorzugt in weniger als 60 Minuten und ganz besonders  
bevorzugt in weniger als 30 bis weniger als 15 Minuten.

Wird ein weiteres oder mehrere weitere Nährmedien wie unter  
Schritt c) beschrieben zum Auffüllen genutzt, kann dieses  
Auffüllen in Form eines oder mehrerer Sätze (batch) bzw.  
30 Chargen oder kontinuierlich oder einer Kombination aus  
beiden Verfahrensweisen erfolgen. Hierbei wird wieder ein  
Füllstand von ca. 100% des ursprünglichen Volumens  
erreicht. Der Begriff „ca. 100%“ bedeutet in diesem  
Zusammenhang, dass es im Rahmen der technischen

Möglichkeiten zu Schwankungen kommen kann, die beispielsweise dazuführen, dass auf 97% - 103%, 98% - 102%, 99% - 101%, 99,5% - 100,5% oder 99,9% - 100,1% des ursprünglichen Volumens aufgefüllt wird.

- 5 Erfolgt das Auffüllen in Form eines oder mehrerer Sätze, geschieht dies erfindungsgemäß schnellstmöglich d.h. in weniger als 180 Minuten, vorzugsweise in weniger als 120 Minuten, besonders bevorzugt in weniger als 60 Minuten, besonders bevorzugt in weniger als 30 Minuten bis weniger
- 10 als 15 Minuten. Nach dem oben beschriebenen Auffüllen auf ca. 100% des ursprünglichen Volumens erfolgt die Kultivierung bis zum Verbrauch der Kohlenstoffquelle oder bis zu einem anderen geeigneten Zeitpunkt kurz vor dem vollständigen Verbrauch der Kohlenstoffquelle, bevor
- 15 wiederum Fermentationsbrühe gemäß Schritt b) abgelassen wird. Zu diesem geeigneten Zeitpunkt beträgt die Konzentration der Kohlenstoffquelle > 0 bis ≤ 5 g/l, > 0 bis ≤ 3 g/l, > 0 bis ≤ 2 g/l, > 0 bis ≤ 2 g/l, > 0 bis ≤ 1 g/l, > 0 bis ≤ 0,5 g/l.
- 20 Beim kontinuierlichen Auffüllen erfolgt das Auffüllen mit einem oder mehreren weiteren Nährmedien unter fortwährender Kultivierung der Fermentationsbrühe bis der Füllstand von annähernd 100% wieder erreicht ist. Die Fermentationsbrühe wird so lange weiterkultiviert bis die Kohlenstoffquelle
- 25 verbraucht oder nahezu (siehe oben) verbraucht ist.

Bei der Kombination aus beiden Verfahrensweisen werden ein oder mehrere weitere Nährmedien in Form eines oder mehrerer Sätze schnellstmöglich zugegeben und anschließend ein oder mehrere weitere Nährmedien kontinuierlich unter

- 30 fortwährender Kultivierung zugeführt werden. Die Fermentationsbrühe wird so lange weiterkultiviert bis die Kohlenstoffquelle verbraucht oder nahezu (siehe oben) verbraucht ist.

Die Kultivierung in den Schritten a) und c) erfolgt unter Bedingungen die die Bildung von L-Threonin erlauben: Während der Kultivierung wird die Temperatur in einem Bereich von 27 bis 45°C, vorzugsweise 29 bis 42°C, besonders bevorzugt 33 bis 40°C, eingestellt. Die Fermentation kann bei Normaldruck oder gegebenenfalls bei Überdruck, vorzugsweise bei 0 bis 2,5 bar Überdruck, besonders bevorzugt bei 0 bis 1,5 bar durchgeführt werden. Der Sauerstoffpartialdruck wird auf 5 bis 50%, vorzugsweise ca. 20%, Luftsättigung geregelt. Die Regelung des pH-Wertes auf pH ca. 6 bis 8, vorzugsweise 6,5 bis 7,5 kann mit 25%igem Ammoniakwasser erfolgen. Die Bedingungen der Kultivierung können während der Kultivierung konstant bleiben oder verändert werden. Ebenso können die Kultivierungsbedingungen in Schritt a) und c) identisch sein oder sich unterscheiden.

Die Wiederholung der Schritte b) und c) gemäß d) erfolgt > (größer) 0 bis 100 mal, bevorzugt 2 bis 90 oder 2 bis 80 mal, besonders bevorzugt 4 bis 70, 4 bis 60, 4 bis 50 oder 4 bis 40 mal und besonders bevorzugt 5 bis 30, 6 bis 30, 7 bis 30, 8 bis 30, 9 bis 30 oder 10 bis 30 mal.

Die Zeit zwischen Abtrennen von mindestens 0,1 Vol.-% bis weniger als 10 Vol.-% des Gesamtvolumens der Fermentationsbrühe, dem vollständigen Auffüllen auf ca. 100%, der sich anschließenden Kultivierung und dem erneuten Abtrennen von Fermentationsbrühe beträgt maximal 10 Stunden oder maximal 5 Stunden, bevorzugt maximal 3 Stunden, besonders bevorzugt maximal 2 Stunden bis maximal 1 Stunde.

Dementsprechend erfolgt das Abtrennen der Fermentationsbrühe, das Wiederauffüllen mit Nährmedium, die sich anschließende Kultivierung und das erneute Abtrennen der Fermentationsbrühe mit einer Geschwindigkeit, die einer mittleren Verweilzeit von kleiner als 100 Stunden oder kleiner als 50 Stunden, bevorzugt kleiner als 30, ganz besonders bevorzugt kleiner als 20 oder kleiner als 10

Stunden entspricht. Dabei ist die mittlere Verweilzeit (residence time) die theoretische Zeit, die Teilchen in einer Kultur verbleiben. Die mittlere Verweilzeit wird beschrieben durch das Verhältnis des Flüssigkeitsvolumens des Reaktors und der Durchflussmenge (Biotechnologie; H. Weide, J. Páca und W. A. Knorre; Gustav Fischer Verlag Jena; 1991). Die Durchflussmenge ist definiert durch das Volumen der abgelassenen Fermentationsbrühe bzw. das Volumen des zum Auffüllen verwendeten Nährmediums oder der weiteren Nährmedien. Die Füllstandmessung kann direkt z.B. über Radarmessung oder indirekt z.B. über eine Massebestimmung erfolgen.

Erfindungsgemäß wird die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Kultivierung gemäß Schritt c) und/oder d) im Allgemeinen bei maximal 30 g/l, bei maximal 20 g/l, bei maximal 10 g/l, bevorzugt bei maximal 5 g/l, besonders bevorzugt maximal 2 g/l eingestellt. Diese Konzentration wird mindestens während 75%, bevorzugt mindestens während 85%, besonders bevorzugt während mindestens 95% der Zeit der Kultivierung gemäß Schritt b) und/oder c) aufrechterhalten. Dabei wird die Konzentration der Kohlenstoffquelle anhand von Methoden bestimmt, die Stand der Technik sind.  $\beta$ -D-Glukose wird z.B. in einem Glukoseanalysator YSI 02700 Select der Firma Yellow Springs Instruments (Yellow Springs, Ohio, USA) bestimmt.

Gegebenenfalls kann die entnommene Kulturbrühe, gegebenenfalls unter Rührung, mit Sauerstoff oder einem sauerstoffhaltigen Gas versehen werden bis die Konzentration der Kohlenstoffquelle unter 2 g/l; unter 1 g/l; oder unter 0,5 g/l sinkt.

In einem erfindungsgemäßen Verfahren beträgt die Ausbeute mindestens 31%; mindestens 33%; mindestens 35%; mindestens 37%; mindestens 40%; mindestens 42%; mindestens 44%; mindestens 46%, mindestens 48%. Dabei ist die Ausbeute definiert als das Verhältnis von der in einer Kultivierung



gesamt gebildeten Menge an L-Threonin zu der Gesamtmenge der eingesetzten oder verbrauchten Kohlenstoffquelle.

In einem erfindungsgemäßen Verfahren wird L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 1,5 bis 2,5 g/l pro Std., von mindestens 2,5 bis 3,5 g/l pro Std., von mindestens 2,5 bis mehr als 3,5 g/l pro Std., von mindestens 3,5 bis 5,0 g/l pro Std., von mindestens 3,5 bis mehr als 5,0 g/l pro Std., oder von mindestens 5,0 bis 8,0 g/l oder mehr pro Std. gebildet. Dabei ist die Raum-Zeit-Ausbeute definiert als das Verhältnis von der in einer Kultivierung gesamt gebildeten Threoninmenge zu dem Volumen der Kultur über den gesamten Zeitraum der Kultivierung gesehen. Die Raum-Zeit-Ausbeute wird auch volumetrische Produktivität genannt.

Naturgemäß wird bei einem Fermentationsverfahren wie dem erfindungsgemäßen das Produkt mit einer bestimmten Ausbeute und mit einer bestimmten Raum-Zeit-Ausbeute (volumetrische Produktivität) hergestellt. In einem erfindungsgemäßen Verfahren kann L-Threonin mit einer Ausbeute von mindestens 31 % und einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 1,5 bis 2,0 g/l pro Std. hergestellt werden. Weitere Kopplungen von Ausbeute mit Raum-Zeit-Ausbeute wie beispielsweise eine Ausbeute von mindestens 37 % und eine Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 2,5 g/l pro Std. ergeben sich zwanglos aus den obigen Ausführungen.

Aus der entnommenen Kulturbrühe kann das L-Threonin gewonnen, gesammelt oder konzentriert und gegebenenfalls gereinigt werden.

Es ist ebenfalls möglich aus der entnommenen Kulturbrühe (=Fermentationsbrühe) ein Produkt herzustellen, indem man die in der Kulturbrühe enthaltene Biomasse des Bakteriums vollständig (100%) oder nahezu vollständig d.h. mehr als oder größer als (>) 90%, >95%, >97%, >99% entfernt und die übrigen Bestandteile der Fermentationsbrühe weitgehend d.h.



zu 30% - 100%, 40% - 100%, 50% - 100%, 60% - 100%, 70% - 100%, 80% - 100%, oder 90% - 100%, bevorzugt größer gleich ( $\geq$ ) 50%,  $\geq 60\%$ ,  $\geq 70\%$ ,  $\geq 80\%$ ,  $\geq 90\%$  oder  $\geq 95\%$  oder auch vollständig (100%) im Produkt belässt.

- 5 Zur Entfernung oder Abtrennung der Biomasse werden Separationsmethoden wie beispielsweise Zentrifugation, Filtration, Dekantieren, Flockung oder eine Kombination hieraus eingesetzt.

- 10 Die erhaltene Brühe wird anschließend mit bekannten Methoden wie beispielsweise mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, durch Nanofiltration oder einer Kombination hieraus eingedickt beziehungsweise konzentriert.

- 15 Diese aufkonzentrierte Brühe wird anschließend durch Methoden der Gefriertrocknung, der Sprühtrocknung, der Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren zu einem vorzugsweise rieselfähigen, feinteiligen Pulver aufgearbeitet. Dieses rieselfähige, feinteilige Pulver kann  
20 dann wiederum durch geeignete Kompaktier- oder Granulier-Verfahren in ein grobkörniges, gut rieselfähiges, lagerbares und weitgehend staubfreies Produkt überführt werden. Das Wasser wird hierbei insgesamt zu mehr als 90% entfernt, sodass der Wassergehalt im Produkt kleiner als  
25 10%, kleiner als 5% beträgt.

Die angegebenen Verfahrensschritte müssen nicht notwendigerweise in der hier aufgeführten Reihenfolge durchgeführt sondern können gegebenenfalls in technisch sinnvoller Weise kombiniert werden.

- 30 Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich gegenüber dem üblichen fed batch-Verfahren, vor allem durch eine erhöhte Raum-Zeit-Ausbeute aus.

Die Analyse von L-Threonin und anderen Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958))  
5 beschrieben, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)) beschrieben.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind L-Threonin produzierende Bakterien der Familie  
10 Enterobacteriaceae, ausgewählt aus den Gattungen Escherichia, Erwinia, Providencia und Serratia geeignet. Die Gattungen Escherichia und Serratia werden bevorzugt. Bei der Gattung Escherichia ist insbesondere die Art Escherichia coli und bei der Gattung Serratia insbesondere  
15 die Art Serratia marcescens zu nennen.

Die Bakterien enthalten mindestens eine Kopie eines thrA-Gens oder Allels, das für eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I kodiert. In der  
Literatur wird in diesem Zusammenhang auch von „feed back“  
20 resistenten oder auch von desensibilisierten Varianten gesprochen. Derartige Bakterien sind typischerweise resistent gegen das Threoninanalogon  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -Hydroxyvaleriansäure (AHV) (Shiio und Nakamori, Agricultural and Biological Chemistry 33 (8), 1152-1160  
25 (1969)). Biochemische Untersuchungen zu „feed back“ resistenten Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I Varianten sind beispielsweise bei Cohen et al. (Biochemical and Biophysical Research Communications 19(4), 546-550 (1965)) und bei Omori et al. (Journal of Bacteriology  
30 175(3), 785-794 (1993)) beschrieben. Gegebenenfalls wird die Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I überexprimiert.

Methoden der Überexpression sind im Stand der Technik hinlänglich - beispielsweise bei Makrides et al.  
35 (Microbiological Reviews 60 (3), 512-538 (1996)) -

beschrieben. Durch Verwendung von Vektoren wird die Kopienzahl um mindestens eine (1) Kopie erhöht. Als Vektoren können Plasmide wie beispielsweise in der US 5,538,873 beschrieben verwendet werden. Als Vektoren können ebenfalls Phagen, beispielsweise der Phage Mu, wie in der EP 0 332 448 beschrieben, oder der Phage lambda ( $\lambda$ ) verwendet werden. Eine Erhöhung der Kopienzahl kann auch dadurch erzielt werden, dass eine weitere Kopie in eine weitere Stelle des Chromosoms - beispielsweise in die att-site des Phagen  $\lambda$  (Yu und Court, Gene 223, 77-81 (1998)) - eingebaut wird. In der US 5,939,307 wird beschrieben, dass durch Einbau von Expressionskassetten oder Promotoren wie beispielsweise tac-Promotor, trp-Promotor, lpp-Promotor oder  $P_L$ -Promotor und  $P_R$ -Promotor des Phagen  $\lambda$  stromaufwärts des chromosomalen Threoninoperons eine Erhöhung der Expression erzielt werden konnte. In gleicher Weise können die Promotoren des Phagen T7, die gear-box-Promotoren oder der nar-Promotor verwendet werden. Derartige Expressionskassetten oder Promotoren können auch verwendet werden um, wie in der EP 0 593 792 beschrieben, plasmidgebundene Gene zu überexprimieren. Durch Verwendung des  $lacI^Q$ -Allels lässt sich wiederum die Expression plasmidgebundener Gene kontrollieren (Glascock und Weickert, Gene 223, 221-231 (1998)). Durch Entfernung des Attenuators des Threonin-Operons (Park et al., Biotechnology Letters 24, 1815-1819 (2002)) oder durch Verwendung der thr79-20 Mutation (Gardner, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 76(4), 1706-1710 (1979)) oder durch Mutation des für die Threonyl-t-RNA-Synthetase kodierenden thrS-Gens wie bei Johnson et al. (Journal of Bacteriology 129(1), 66-70 (1977) beschrieben kann ebenfalls eine Überexpression erzielt werden. Durch die beschriebenen Maßnahmen wird die intrazelluläre Konzentration der jeweiligen Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I Proteinvariante um mindestens 10% im Vergleich zum Ausgangsstamm erhöht.

Ein geeignetes thrA-Allel ist in der US 4,278,765 beschrieben und in Form des Stammes MG442 bei der Russischen Nationalsammlung für industrielle Mikroorganismen (VKPM, Moskau, Russland) unter der Zugangsnummer CMIM B-1628 erhältlich. Andere geeignete thrA-Allele sind in der WO 00/09660 und WO 00/09661 beschrieben und bei dem Korean Culture Centre of Microorganisms (KCCM, Seoul, Korea) unter den Zugangsnummern KCCM 10132 und KCCM 10133 erhältlich. Ein weiteres geeignetes thrA-Allel ist in dem Stamm H-4581 vorhanden, der in der US 4,996,147 beschrieben und unter der Zugangsnummer Ferm BP-1411 beim National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (1-1-1 Higashi, Tsukuba Ibaraki, Japan) erhältlich ist. Schließlich sind weitere thrA-Allele in der US 3,580,810 beschrieben, welche in Form der bei der ATCC hinterlegten Stämme ATCC 21277 und ATCC 21278 erhältlich sind. Ein weiteres Allel ist in der US 3,622,453 beschrieben und in Form des Stammes KY8284 unter der Zugangsnummer ATCC 21272 bei der ATCC erhältlich. Darüber hinaus ist in der WO 02/064808 ein weiteres thrA-Allel beschrieben und in Form von Stamm pGmTN-PPC12 unter der Zugangsnummer KCCM 10236 bei der KCCM hinterlegt.

Gegebenenfalls können thrA-Allele, die für „feed back“ resistente Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I Varianten kodieren, mit den hinlänglich bekannten Methoden der konventionellen Mutagenese von Zellen unter Verwendung von mutagenen Stoffen beispielsweise N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidin (MNNG) oder Ethylmethansulfonat (EMS) oder mutagenen Strahlen beispielsweise UV-Strahlen und anschließender Selektion von Threoninanaloga (beispielsweise AHV) resistenten Varianten isoliert werden. Derartige Mutagenesemethoden sind beispielsweise bei Shio und Nakamori (Agricultural and Biological Chemistry 33 (8), 1152-1160 (1969)) oder bei Saint-Girons und Margerita (Molecular and General Genetics 162, 101-107 (1978)) oder in dem bekannten Handbuch von J. H. Miller (A Short Course



In Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 1992) insbesondere auf den Seiten 135 bis 156 beschrieben. Shio und Nakamori  
5 behandeln beispielsweise eine Zellsuspension von Escherichia coli für ca. 15 Minuten mit 0,5 mg/ml MNNG in einem 0,1 M Natriumphosphatpuffer von pH 7 bei Raumtemperatur (d. h. im Allgemeinen ca. 16 bis 26°C) zur Erzeugung von Mutationen. Miller empfiehlt beispielsweise  
10 eine Behandlung für 5 bis 60 Minuten mit 30 µl EMS pro 2 ml Zellsuspension in 0,1 M TRIS-Puffer bei pH 7,5 bei einer Temperatur von 37°C. Diese Mutagenesebedingungen können in naheliegender Weise abgeändert werden. Die Selektion von AHV-resistenten Mutanten erfolgt auf Minimalagar, der  
15 typischerweise 2 bis 10 mM AHV enthält. Die entsprechenden Allele können anschließend kloniert und einer Sequenzbestimmung und die von diesen Allelen kodierten Proteinvarianten einer Aktivitätsbestimmung unterzogen werden. Gegebenenfalls können die erzeugten Mutanten auch  
20 direkt verwendet werden. Das Wort „direkt“ bedeutet, dass die erzeugte Mutante für die Herstellung von L-Threonin in einem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden kann oder dass an dieser Mutante weitere Veränderungen zur Erhöhung der Leistungseigenschaften, wie beispielsweise  
25 Abschwächung des Threoninabbaus oder Überexpression des Threoninoperons durchgeführt werden können.

In gleicher Weise können auch Methoden der in-vitro Mutagenese verwendet werden wie sie beispielsweise in dem bekannten Handbuch von Sambrook et al. (Molecular Cloning,  
30 A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989) beschrieben sind. Entsprechende Methoden sind auch kommerziell in Form sogenannter „kits“ wie beispielsweise der von Papworth et al. (Strategies 9(3), 3-4 (1996)) beschriebene „QuikChange  
35 Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene (La Jolla, USA) verfügbar.



Diese Mutagenesemethoden können naturgemäß auch auf andere Gene, Allele oder Stämme beziehungsweise Fragestellungen und Aufgaben, wie beispielsweise der Erzeugung und Isolierung von Mutanten, die gegenüber L-Threonin resistent  
5 sind, angewendet werden.

Bevorzugt werden solche thrA-Allele, die für Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I Varianten kodieren, die in Gegenwart von 10 mM L-Threonin mindestens 40%, mindestens 45%, mindestens 50%, mindestens 55% oder mindestens 60%,  
10 der Homoserin-Dehydrogenase Aktivität und/oder die in Gegenwart von 1 mM L-Threonin mindestens 60%, mindestens 70%, mindestens 75% oder mindestens 80%, der Homoserin-Dehydrogenase Aktivität im Vergleich zur Aktivität in Abwesenheit von L-Threonin aufweisen. Gegebenenfalls  
15 beträgt die Aspartatkinase-Aktivität der genannten Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I Varianten in Gegenwart von 10 mM L-Threonin mindestens 60%, mindestens 65%, mindestens 70%, mindestens 75% bis oder mindestens 80% der Aktivität in Abwesenheit von L-Threonin.

20 Darüber hinaus sind Bakterien der Familie Enterobacteriaceae geeignet, die ein Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und amber, bevorzugt amber im rpoS-Gen und einen t-RNA-Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor, ochre-Suppressor und amber-Suppressor, bevorzugt amber-Suppressor enthalten. Die  
25 amber-Mutation liegt vorzugsweise an der Position 33 entsprechend der Aminosäuresequenz des RpoS-Genproduktes. Als amber-Suppressor wird vorzugsweise supE eingesetzt. Diese Bakterien sind in PCT/EP02/02055 beschrieben. Ein  
30 Stamm, der die beschriebene Mutation im rpoS-Gen und den Suppressor supE enthält, ist unter der Zugangsnummer DSM 15189 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) erhältlich.

Die Nukleotidsequenz des rpoS-Gens kann dem Stand der  
35 Technik entnommen werden. Die Nukleotidsequenz des rpoS-

Gens entsprechend der Accession No. AE000358 ist als SEQ ID NO. 1 dargestellt. Die Aminosäuresequenz des dazugehörigen RpoS-Genproduktes bzw. Proteins ist in der SEQ ID NO. 2 dargestellt. Die Nukleotidsequenz eines rpoS-Allels, das  
5 ein Stopkodon vom Typ amber an der Stelle der Nukleotidsequenz entsprechend Position 33 der Aminosäuresequenz des RpoS-Genproduktes bzw. Proteins, entsprechend SEQ ID NO. 1 bzw. SEQ ID NO. 2, enthält, ist in SEQ ID NO. 3 wiedergegeben. Der Suppressor supE ist im  
10 Stand der Technik beschrieben und als SEQ ID NO. 4 dargestellt.

Darüber hinaus sind Bakterien der Familie Enterobacteriaceae geeignet, die nicht in der Lage sind unter aeroben Kulturbedingungen Threonin abzubauen bzw. als  
15 Stickstoffquelle zu verwerten. Unter aeroben Kulturbedingungen versteht man solche, bei denen der Sauerstoffpartialdruck in der Fermentationskultur während 90%, bevorzugt 95%, ganz besonders bevorzugt 99% der Fermentationsdauer größer (>) 0% beträgt. Ein derartiger  
20 Stamm ist beispielsweise der von Okamoto (Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 61(11), 1877-1882 (1997)) beschriebene Stamm KY10935. Stämme, die nicht in der Lage sind Threonin unter Stickstoffabspaltung abzubauen, besitzen im Allgemeinen eine abgeschwächte vom tdh-Gen  
25 kodierte Threonin-Dehydrogenase (EC 1.1.1.103). Das Enzym wurde von Aronson et al. (The Journal of Biological Chemistry 264(9), 5226-5232 (1989)) beschrieben. Abgeschwächte tdh-Gene sind beispielsweise bei Ravnkar und Somerville (Journal of Bacteriology, 1986, 168(1), 434-  
30 436), in der US 5,705,371, in der WO 02/26993 und bei Komatsubara (Bioprocess Technology 19, 467-484 (1994)) beschrieben.

Ein geeignetes tdh-Allel ist in der US 5,538,873 beschrieben und in Form des Stammes B-3996 unter der  
35 Zugangsnummer 1876 bei der Russischen Nationalsammlung für

industrielle Mikroorganismen (VKPM, Moskau, Russland) erhältlich. Ein weiteres tdh-Allel ist in der US 5,939,307 beschrieben und in Form des Stammes kat-13 unter der Zugangsnummer NRRL B-21593 bei der Agriculture Research Service Patent Culture Collection (Peoria, Illinois, USA) erhältlich. Schließlich ist ein tdh-Allel in der WO 02/26993 beschrieben und in Form des Stammes TH21.97 unter der Zugangsnummer NRRL B-30318 bei der NRRL hinterlegt. Das für eine defekte Threonin Dehydrogenase kodierende Allel 10 tdh-1::cat1212 ist beim E. coli Genetic Stock Center (New Haven, Conn., USA) unter der Zugangsnummer CGSC 6945 erhältlich.

Darüber hinaus sind Bakterien der Familie Enterobacteriaceae geeignet, die eine mindestens partielle 15 Isoleucin-Bedürftigkeit („leaky“-Phänotyp) besitzen, welche durch Gabe von L-Isoleucin in einer Konzentration von mindestens 10, 20 oder 50 mg/l oder L-Threonin in einer Konzentration von mindestens 50, 100 oder 500 mg/l kompensierbar ist.

20 Unter Bedürftigkeit bzw. Auxotrophie versteht man im Allgemeinen die Tatsache, dass ein Stamm infolge einer Mutation eine Wildtypfunktion beispielsweise eine Enzymaktivität vollständig verloren hat und zum Wachstum die Zugabe eines Supplementes beispielsweise eine 25 Aminosäure benötigt. Von partieller Bedürftigkeit oder partieller Auxotrophie spricht man dann, wenn infolge einer Mutation eine Wildtypfunktion beispielsweise die Aktivität eines Enzyms aus dem Biosyntheseweg einer Aminosäure beeinträchtigt beziehungsweise abgeschwächt aber nicht 30 vollständig ausgeschaltet ist. Stämme mit partieller Bedürftigkeit besitzen in Abwesenheit des Supplementes typischerweise eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte, d.h. größer (>) 0% und kleiner (<) 90%, 50%, 25% oder 10% Wachstumsgeschwindigkeit. In der Literatur wird dieser 35 Zusammenhang auch als „leaky“-Phänotyp oder „leakyness“

bezeichnet (Griffiths et al.: An Introduction to Genetic Analysis. 6<sup>th</sup> edition, 1996, Freeman and Company, New York, USA).

Ein Stamm mit einer derartigen partiellen Isoleucin-  
5 Bedürftigkeit ist beispielsweise in der WO 01/14525  
beschrieben und in Form des Stammes DSM9906 unter der  
Zugangsnummer KCCM 10168 bei der KCCM hinterlegt. Threonin  
ausscheidende bzw. produzierende Stämme mit einer  
Isoleucin-Bedürftigkeit besitzen im Allgemeinen eine  
10 abgeschwächte vom *ilvA*-Gen kodierte Threonin-Deaminase  
(E.C. Nummer 4.3.1.19). Die Threonin-Deaminase ist auch  
unter dem Namen Threonin-Dehydratase bekannt. Ein  
abgeschwächtes *ilvA*-Gen, das eine partielle Isoleucin-  
Auxotrophie bewirkt, ist beispielsweise in der US 4,278,765  
15 beschrieben und in Form des Stammes MG442, hinterlegt unter  
der Zugangsnummer B-1682, bei der VKPM erhältlich.

Ein weiteres abgeschwächtes *ilvA*-Gen ist beispielsweise in  
der WO 00/09660 beschrieben und in Form des Stammes DSM  
9807, hinterlegt unter der Zugangsnummer KCCM-10132, bei  
20 der KCCM erhältlich. Weitere abgeschwächte *ilvA*-Gene sind  
bei Komatsubara (Bioprocess Technology 19, 467-484 (1994))  
beschrieben.

Die Aminosäuresequenz einer geeigneten und neuen Threonin-  
Deaminase besteht beispielsweise in der Sequenz von SEQ ID  
25 NO. 6 wobei an Position 286 jede Aminosäure außer  
Glutaminsäure enthalten sein kann. Bevorzugt wird der  
Austausch Glutaminsäure gegen Lysin (E286K).

Mit dem Begriff „Aminosäure“ sind insbesondere die  
proteinogenen L-Aminosäuren einschließlich ihrer Salze,  
30 ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin,  
L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-  
Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-  
Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan, L-Prolin  
und L-Arginin gemeint.



In SEQ ID NO. 8 ist die Aminosäuresequenz einer Threonin-Deaminase angegeben, die an Position 286 die Aminosäure Lysin enthält; die dazugehörige Nukleotidsequenz ist als SEQ ID NO. 7 dargestellt. Diese enthält an Position 856 die 5 Nukleobase Adenin.

- Eine andere geeignete Threonin-Deaminase ist die von Lee et al. (Journal of Bacteriology 185 (18), 5442-5451 (2003)) beschriebene Variante, bei der an Position 97 Serin gegen Phenylalanin (S97F) ausgetauscht ist. Weitere geeignete
- 10 Threonin-Deaminasen sind die von Fischer und Eisenstein (Journal of Bacteriology 175 (20), 6605-6613 (1993)) beschriebenen Varianten, welche mindestens einen der Aminosäureaustausche ausgewählt aus der Gruppe: Austausch von Asparagin an Position 46 gegen Asparaginsäure (N46D),
- 15 Austausch von Alanin an Position 66 gegen Valin (A66V), Austausch von Prolin an Position 156 gegen Serin (P156S), Austausch von Glycin an Position 248 gegen Cystein (G248C) und Austausch von Asparaginsäure an Position 266 gegen Tyrosin (D266Y) besitzen.
- 20 Durch Insertions- oder Deletions-Mutagenese von mindestens einem Basenpaar beziehungsweise Nukleotid oder durch Insertion oder Deletion von mindestens einem Kodon in der Kodierregion oder durch Einbau eines Stopkodons durch Transitions- oder Transversions-Mutagenese in die
- 25 Kodierregion des *ilvA*-Gens lassen sich Allele isolieren, bei denen die Expression des *ilvA*-Gens im Allgemeinen vollständig ausgeschaltet ist. Diese Methode ist auch auf andere Gene, Allele oder offene Leserahmen wie beispielsweise das für die Threonin-Dehydrogenase
- 30 kodierende *tdh*-Gen übertragbar.

Darüber hinaus sind Bakterien der Familie Enterobacteriaceae geeignet, die in ihrem Wachstum resistent gegenüber der Hemmung durch L-Threonin und/ oder L-Homoserin sind. Threonin-resistente Stämme und deren

35 Herstellung sind beispielsweise bei Astaurova et al.



- (Prikladnaya Biokhimiya Microbiologiya (1985), 21(5), 485 als englische Übersetzung: Applied Biochemistry and Microbiology (1986), 21, 485-490)) beschrieben. Die von Austaurova beschriebene Mutante ist gegenüber 40 mg/ml L-Threonin resistent. Weiterhin ist beispielsweise in der US 5,175,107 der Stamm 472T23 beschrieben, der in Gegenwart von 5 mg/ml L-Threonin wachsen kann und gleichzeitig resistent gegen L-Homoserin ist. Der Stamm 472T232 ist unter der Zugangsnummer BKIIM B-2307 bei der VKPM und unter der Nummer ATCC 9801 bei der ATCC erhältlich. Weiterhin ist in der WO 00/09660 der Stamm DSM 9807 beschrieben, der auf einem festen Nährboden wachsen kann, welcher 7% L-Threonin enthält. Der Stamm DSM 9807 ist unter der Zugangsnummer KCCM-10132 bei der KCCM erhältlich. Schließlich ist in der WO 01/14525 der Stamm DSM 9906 beschrieben, der in einem Medium wachsen kann, das 60% bis 70% einer L-Threonin-Fermentationsmutterlauge (L-threonine fermentation mother liquid) enthält. Der Stamm DSM 9906 ist unter der Zugangsnummer KCCM-10168 bei der KCCM erhältlich.
- Es ist bekannt (siehe EP 0994 190 A2 und Livshits et al. (Research in Microbiology 154, 123-135 (2003))), dass durch Verstärkung des rhtA-Gens Resistenz gegenüber L-Threonin und L-Homoserin hervorgerufen wird. Die Verstärkung kann durch Erhöhung der Kopienzahl des Gens oder durch Einsatz der rhtA23-Mutation erzielt werden.

In der EP 0 994 190 A2 wird beschrieben, dass die Verstärkung des rhtB-Gens Resistenz gegenüber L-Homoserin und L-Threonin, insbesondere gegen L-Homoserin bewirkt und die Threoninproduktion verbessert. Durch Überexpression des RhtB-Genproduktes in einem als N99 bezeichneten Stamm konnte die minimale Hemmkonzentration von 250 µg/ml auf 30000 µg/ml gesteigert werden.

In der EP 1 013 765 A1 wird beschrieben, dass eine Verstärkung des rhtC-Gens Resistenz gegenüber L-Threonin hervorruft und die Threoninproduktion verbessert. Als

resistent gegenüber L-Threonin wird ein Stamm bezeichnet, der in Gegenwart einer Konzentration von mindestens 30 mg/ml L-Threonin auf einem Minimalagar wachsen kann. Es wird weiterhin beschrieben, dass eine Verstärkung des rhtB-Gens Resistenz gegenüber L-Homoserin bewirkt und die Threoninproduktion verbessert. Als resistent gegenüber L-Homoserin wird ein Stamm bezeichnet, der in Gegenwart einer Konzentration von mindestens 5 mg/ml L-Homoserin auf einem Minimalagar wachsen kann. In der genannten Patentanmeldung werden Stämme beschrieben, die resistent gegenüber 10 mg/ml L-Homoserin und resistent gegenüber 50 mg/ml L-Threonin sind. In der US 4,996,147 wird der Stamm H-4581 beschrieben, der gegen 15 g/l Homoserin resistent ist. Der Stamm H-4581 ist unter der Zugangsnummer FERM BP-1411 beim National Institute of Advanced Industrial Science and Technology erhältlich.

In der EP 1 016 710 A2 wird beschrieben, dass eine Verstärkung des offenen Leserahmens bzw. Gens yfiK oder yeaS Resistenz gegenüber L-Threonin und L-Homoserin bewirkt. Durch Überexpression des YfiK-Genproduktes in einem als TG1 bezeichneten Stamm konnte die minimale Hemmkonzentration bezüglich L-Homoserin von 500 µg/ml auf 1000 µg/ml und bezüglich L-Threonin von 30000 µg/ml auf 40000 µg/ml gesteigert werden. Durch Überexpression des YeaS-Genproduktes konnte die minimale Hemmkonzentration bezüglich L-Homoserin von 500 µg/ml auf 1000 µg/ml und bezüglich L-Threonin von 30000 µg/ml auf 50000 µg/ml gesteigert werden. In der genannten Patentanmeldung wird weiterhin gezeigt, dass durch Überexpression des YfiK-Genproduktes die Threoninproduktion verbessert wird.

Gemäß diesen technischen Anleitungen werden Stämme hergestellt die in Gegenwart von  $\geq$  (mindestens)  $\geq 5$  g/l,  $\geq 10$ ,  $\geq 20$  g/l,  $\geq 30$  g/l,  $\geq 40$  g/l,  $\geq 50$  g/l,  $\geq 60$  g/l und  $\geq 70$  g/l L-Threonin wachsen können, d. h. gegenüber L-Threonin resistent sind, und für die Herstellung von L-

Threonin in einem erfindungsgemäßen Verfahren geeignet sind.

Für das erfindungsgemäße Verfahren sind insbesondere Stämme geeignet, die mindestens folgende Merkmale aufweisen:

- 5 a) eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I, welche gegebenenfalls überexprimiert vorliegt, und
- b) ein Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und amber, bevorzugt amber im rpoS-Gen und einen t-RNA-Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor, ochre-Suppressor und amber-Suppressor, bevorzugt amber-Suppressor.

Für das erfindungsgemäße Verfahren sind außerdem insbesondere Stämme geeignet, die mindestens folgende  
15 Merkmale aufweisen:

- a) eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I, welche gegebenenfalls überexprimiert vorliegt,
- b) nicht in der Lage sind unter aeroben Kulturbedingungen Threonin abzubauen, bevorzugt durch Abschwächung der Threonin-Dehydrogenase,
- c) eine mindestens partielle Isoleucin-Bedürftigkeit, und
- d) Wachstum in Gegenwart von mindestens 5 g/l Threonin.

Für das erfindungsgemäße Verfahren sind ganz besonders  
25 Stämme geeignet, die mindestens folgende Merkmale aufweisen:

- a) eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I, welche gegebenenfalls überexprimiert vorliegt,

- b) ein Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und amber, bevorzugt amber im rpoS-Gen und einen t-RNA-Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor, ochre-Suppressor und amber-Suppressor, bevorzugt amber-Suppressor,
- c) nicht in der Lage sind unter aeroben Kulturbedingungen Threonin abzubauen, bevorzugt durch Abschwächung der Threonin-Dehydrogenase,
- d) eine mindestens partielle Isoleucin-Bedürftigkeit, und
- e) Wachstum in Gegenwart von mindestens 5 g/l Threonin.

Darüber hinaus können die für das erfindungsgemäße Verfahren eingesetzten Bakterien weiterhin eines oder mehrere der folgenden Merkmale aufweisen:

- Abschwächung der vom pckA-Gen kodierten Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEP-Carboxykinase) wie beispielsweise in der WO 02/29080 beschrieben,
- Abschwächung der vom pgi-Gen kodierten Phosphoglucose-Isomerase (Froman et al. Molecular and General Genetics 217(1):126-31 (1989)).
- Abschwächung des vom offenen Leserahmens ytfP kodierten YtfP-Genproduktes wie beispielsweise in der WO 02/29080 beschrieben,
- Abschwächung des vom offenen Leserahmen yjfa kodierten Yjfa-Genproduktes wie beispielsweise in der WO 02/29080 beschrieben,
- Abschwächung der vom poxB-Gen kodierten Pyruvat-Oxidase wie beispielsweise in der WO 02/36797 beschrieben,
- Abschwächung des vom offenen Leserahmen yjgF kodierten YjgF-Genproduktes wie beispielsweise in der PCT/EP03/14271 beschrieben. Der yjgF-Orf von Escherichia

- coli ist von Wasinger VC. und Humphery-Smith I. (FEMS Microbiology Letters 169(2): 375-382 (1998)), Volz K. (Protein Science 8(11): 2428-2437 (1999)) und Parsons et al. (Biochemistry 42(1): 80-89 (2003)) beschrieben  
5 worden. Die dazugehörigen Nukleotid bzw. Aminosäuresequenzen sind unter der Zugangsnummer (Accession No.) AE000495 in öffentlichen Datenbanken verfügbar. Der besseren Übersichtlichkeit halber sind diese als SEQ ID NO. 9 und SEQ ID NO. 10 dargestellt.
- 10 • Verstärkung der von den Genen pntA und pntB kodierten Transhydrogenase wie beispielsweise in der EP 0 733 712 A1 beschrieben,
- Verstärkung der von dem pps-Gen kodierten  
15 Phosphoenolpyruvat-Synthase wie beispielsweise in der EP 0 877 090 A1 beschrieben,
- Verstärkung der vom ppc-Gen kodierten  
Phosphoenolpyruvat-Carboxylase wie beispielsweise in der EP 0 723 011 A1 beschrieben, und
- 20 • Verstärkung des vom rseB-Gen kodierten Regulators RseB wie beispielsweise in der EP 1382685 beschrieben. Der Regulator RseB ist von Missiakas et al. (Molecular Microbiology 24(2), 355-371 (1997)), De Las Penas et al. (Molecular Microbiology 24(2): 373-385 (1997)) und Collinet et al. (Journal of Biological Chemistry  
25 275(43): 33898-33904 (2000)) beschrieben worden. Die dazugehörigen Nukleotid bzw. Aminosäuresequenzen sind unter der Zugangsnummer (Accession No.) AE000343 in öffentlichen Datenbanken verfügbar.
- Verstärkung des vom galP-Gen kodierten Galaktose-Proton  
30 Symporter's (= Galaktose-Permease) wie beispielsweise in der DE 10314618.0 beschrieben. Das galP-Gen und seine Funktion sind von Macpherson et al. (The Journal of Biological Chemistry 258(7): 4390-4396 (1983)) und



Venter et al. (The Biochemical Journal 363 (Pt 2): 243-252 (2002)) beschrieben worden. Die dazugehörigen Nukleotid bzw. Aminosäuresequenzen sind unter der Zugangsnummer (Accession No.) AE000377 in öffentlichen  
5 Datenbanken verfügbar.

- Fähigkeit Saccharose als Kohlenstoffquelle verwenden zu können. Genetische Determinanten zur Saccharoseverwertung sind im Stand der Technik beispielsweise in der FR-A-2559781, bei Debabov (In: Proceedings of the IV International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms 1982. Kodansha Ltd, Tokyo, Japan, p 254-258), Smith and Parsell (Journal of General Microbiology 87, 129-140 (1975)) und Livshits et al. (In: Conference on Metabolic Bacterial Plasmids. Tartusk University Press, Tallin, Estland  
10 (1982), p 132-134 und 144-146) und in der US 5,705,371 beschrieben. Die genetischen Determinanten zur Saccharoseverwertung des von Smith und Parsell beschriebenen Stammes H155 wurden durch Konjugation in  
15 eine gegen Nalidixinsäure resistente Mutante von Escherichia coli K-12 überführt und die entsprechende Transkonjugante am 16. März 2004 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) als DSM 16293 hinterlegt.  
20 Genetische Determinanten zur Saccharoseverwertung sind ebenfalls in dem in der US 5,631,157 beschriebenen Stamm 472T23 enthalten, der bei der ATCC unter Bezeichnung ATCC 9801 erhältlich ist. Eine weitere genetische Determinante zur Saccharoseverwertung wurde von Bockmann  
25 et al. (Molecular and General Genetics 235, 22-32 (1992)) beschrieben und ist unter der Bezeichnung csc-System bekannt.  
30
- Verstärkung des vom offenen Leserahmen yedA kodierten YedA-Genproduktes wie beispielsweise in der WO 03/044191  
35 beschrieben.

- 5 • Wachstum in Gegenwart mindestens 0,1 bis 0,5 mM oder mindestens 0,5 bis 1 mM Borrelidin (Borrelidinresistenz) wie in US 5,939,307 beschrieben. Der gegen Borrelidin resistente Stamm kat-13 ist unter der Zugangsnummer NRRL B-21593 bei der NRRL erhältlich.
- 10 • Wachstum in Gegenwart von mindestens 2 bis 2,5 g/l oder mindestens 2,5 bis 3 g/l Diaminovernsteinsäure (Diaminovernsteinsäure Resistenz) wie in WO 00/09661 beschrieben. Der gegen Diaminovernsteinsäure resistente Stamm DSM 9806 ist unter der Zugangsnummer KCCM-10133 bei der KCCM erhältlich.
- 15 • Wachstum in Gegenwart von mindestens 30 bis 40 mM oder mindestens 40 bis 50 mM  $\alpha$ -Methylserin ( $\alpha$ -Methylserin Resistenz) wie in WO 00/09661 beschrieben. Der gegen  $\alpha$ -Methylserin resistente Stamm DSM 9806 ist unter der Zugangsnummer KCCM-10133 bei der KCCM erhältlich.
- 20 • Wachstum in Gegenwart von höchstens 30 mM oder höchstens 40 mM oder höchstens 50 mM Fluorobrenztraubensäure (Fluorobrenztraubensäure Sensitivität) wie in WO 00/09661 beschrieben. Der gegen Fluorobrenztraubensäure sensitive Stamm DSM 9806 ist unter der Zugangsnummer KCCM-10133 bei der KCCM erhältlich.
- 25 • Wachstum in Gegenwart von mindestens 210 mM oder mindestens 240 mM oder mindestens 270 mM oder mindestens 300 mM L-Glutaminsäure (Glutaminsäure Resistenz) wie in WO 00/09660 beschrieben. Der gegen Glutaminsäure resistente Stamm DSM 9807 ist unter der Zugangsnummer KCCM-10132 bei der KCCM erhältlich.
- 30 • Eine mindestens partielle Bedürftigkeit für Methionin. Ein Stamm mit einer mindestens partiellen Methionin Bedürftigkeit ist beispielsweise der in der US 5,017,483 beschriebene Stamm H-4257, der unter der Zugangsnummer FERM BP-984 beim National Institute of Advanced

Industrial Science and Technology erhältlich ist. Durch Zugabe von mindestens 25, 50 oder 100 mg/l L-Methionin ist die Bedürftigkeit kompensierbar.

- 5 • Eine mindestens partielle Bedürftigkeit für m-Diaminopimelinsäure. Ein Stamm mit einer mindestens partiellen m-Diaminopimelinsäure Bedürftigkeit ist beispielsweise der in der US 5,017,483 beschriebene Stamm H-4257, der unter der Zugangsnummer FERM BP-984 beim National Institute of Advanced Industrial Science and Technology erhältlich ist. Durch Zugabe von mindestens 25, 50 oder 100 mg/l m-Diaminopimelinsäure ist die Bedürftigkeit kompensierbar.
- 10
- 15 • Wachstum in Gegenwart von mindestens 100 mg/l Rifampicin (Rifampicin Resistenz) wie in US 4,996,147 beschrieben. Der gegen Rifampicin resistente Stamm H-4581 ist unter der Zugangsnummer FERM BP-1411 beim National Institute of Advanced Industrial Science and Technology erhältlich.
- 20 • Wachstum in Gegenwart von mindestens 15 g/l L-Lysin (Lysin Resistenz) wie in US 4,996,147 beschrieben. Der gegen L-Lysin resistente Stamm H-4581 ist unter der Zugangsnummer FERM BP-1411 beim National Institute of Advanced Industrial Science and Technology erhältlich.
- 25 • Wachstum in Gegenwart von mindestens 15 g/l Methionin (Methionin Resistenz) wie in US 4,996,147 beschrieben. Der gegen Methionin resistente Stamm H-4581 ist unter der Zugangsnummer FERM BP-1411 beim National Institute of Advanced Industrial Science and Technology erhältlich.
- 30 • Wachstum in Gegenwart von mindestens 15 g/l L-Asparaginsäure (Asparaginsäure Resistenz) wie in US 4,996,147 beschrieben. Der gegen L-Asparaginsäure resistente Stamm H-4581 ist unter der Zugangsnummer FERM

BP-1411 beim National Institute of Advanced Industrial Science and Technology erhältlich.

- Verstärkung der vom pyc-Gen kodierten Pyruvat-Carboxylase. Geeignete pyc-Gene bzw. Allele sind  
5 beispielsweise die von *Corynebacterium glutamicum* (WO 99/18228, WO 00/39305 und WO 02/31158), *Rhizobium etli* (US 6,455,284), *Bacillus subtilis* (EP 1092776).  
Gegebenfalls kann auch das pyc-Gen von weiteren  
10 Mikroorganismen verwendet werden, die endogen eine Pyruvat-Carboxylase enthalten, wie beispielsweise *Methanobacterium thermoautotrophicum* oder *Pseudomonas fluorescens*.

Bei Verwendung Saccharose-haltiger Nährmedien werden die  
15 Stämme mit genetischen Determinanten zur Saccharoseverwertung ausgerüstet.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang  
die Erhöhung der intrazellulären Aktivität oder  
Konzentration eines oder mehrerer Enzyme oder Proteine in  
einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA  
20 kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des offenen Leserahmens, Gens oder Allels bzw. der offenen Leserahmen, Gene oder Allele um mindestens eine (1) Kopie erhöht, einen starken Promotor oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein  
25 mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Bei den Maßnahmen der Verstärkung und auch bei den  
Maßnahmen der Abschwächung wird die Verwendung endogener  
Gene, Allele oder offener Leserahmen im Allgemeinen  
30 bevorzugt. Unter „endogenen Genen“ oder „endogenen Nukleotidsequenzen“ versteht man die in der Population einer Art vorhandenen Gene oder offene Leserahmen oder Allele beziehungsweise Nukleotidsequenzen.

Bei Verwendung von Plasmiden zur Erhöhung der Kopienzahl werden diese gegebenenfalls stabilisiert durch einen oder mehreren der genetischen Orte (Loci) ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus dem *parB* Locus des Plasmides R1 beschrieben von Rasmussen et al. (Molecular and General Genetics 209 (1), 122-128 (1987)), Gerdes et al. (Molecular Microbiology 4 (11), 1807-1818 (1990)) und Thistedt und Gerdes (Journal of Molecular Biology 223 (1), 41-54 (1992)), dem *flm* Locus des F Plasmids beschrieben von Loh et al. (Gene 66 (2), 259-268 (1988)), dem *par* Locus des Plasmids pSC101 beschrieben von Miller et al. (Gene 24 (2-3), 309-315 (1983)), dem *cer* Locus des Plasmids ColE1 beschrieben von Leung et al. (DNA 4 (5), 351-355 (1985)), dem *par* Locus des Plasmids RK2 beschrieben von Sobecky et al. (Journal of Bacteriology 178 (7), 2086-2093 (1996)) und Roberts and Helinsky (Journal of Bacteriology 174 (24), 8119-8132 (1992)), dem *par* Locus des Plasmids RP4 beschrieben von Eberl et al. (Molecular Microbiology 12 (1), 131-141 (1994)) and dem *para* Locus des Plasmids R1 beschrieben von Gerdes and Molin (Journal of Molecular Biology 190 (3), 269- 279 (1986)), Dam and Gerdes (Journal of Molecular Biology 236 (5), 1289- 1298 (1994)) and Jensen et al (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 95 (15), 8550-8555 (1998)).

25 Durch die Maßnahmen der Verstärkung, insbesondere Überexpression, wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins oder Enzyms im Allgemeinen um mindestens 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% oder 500%, maximal bis 1000% oder 2000% bezogen auf die des Wildtyp-Proteins beziehungsweise der Aktivität oder  
30 Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus erhöht.

Zur Erzielung einer Verstärkung können beispielsweise die Expression der Gene oder die katalytischen oder  
35 funktionellen Eigenschaften der Enzyme oder Proteine erhöht.



werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

So kann beispielsweise die Kopienzahl der entsprechenden Gene um mindestens eine (1) erhöht werden, oder es kann die  
5 Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare  
10 Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Threonin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des  
15 Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung  
20 der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität oder Konzentration eines oder  
25 mehrerer Enzyme oder Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor oder einen offenen Leserahmen oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer niedrigen  
30 Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Enzym bzw. Protein oder Gen inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Durch die Maßnahmen der Abschwächung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins oder Enzyms  
35 im Allgemeinen auf 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis

10%, 0 bis 5% oder 0 bis 1% oder 0 bis 0,1% der Aktivität oder Konzentration des Wildtyp-Proteins, beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus, herabgesenkt.

- 5 Zur Erzielung einer Abschwächung können beispielsweise die Expression der Gene oder offenen Leserahmen oder die katalytischen oder funktionellen Eigenschaften der Enzyme oder Proteine herabgesetzt bzw. ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.
- 10 Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung, durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression oder auch durch Antisense-RNA Technik erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene,
- 15 Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem beispielsweise bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195 (1998)), bei Carrier und
- 20 Keasling (Biotechnology Progress 15: 58-64 (1999)), Franch und Gerdes (Current Opinion in Microbiology 3: 159-164 (2000)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie beispielsweise dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme
- 25 Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).
- Mutationen, die zu einer Veränderung beziehungsweise Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von
- 30 Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt. Als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Yano et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 5511-5515
- 35 (1998)), Wentz und Schachmann (Journal of Biological

Chemistry 266: 20833-20839 (1991)) genannt.

Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 5 1986) entnommen werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen von mindestens einem (1) Basenpaar bzw. Nukleotid in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des durch die Mutation hervorgerufenen

10 Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen („missense mutations“) oder Nichtsinnmutationen („nonsense mutations“) gesprochen. Die Fehlsinnmutation führt zu einem Austausch einer gegebenen Aminosäure in einem Protein gegen eine andere, wobei es

15 sich insbesondere um einen nicht-konservativen Aminosäureaustausch handelt. Hierdurch wird die Funktionsfähigkeit bzw. Aktivität des Proteins beeinträchtigt und auf einen Wert von 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10%, 0 bis 5% 0 bis 1% oder 0 bis 0,1%

20 reduziert. Die Nichtsinnmutation führt zu einem Stop-Kodon im Kodierbereich des Gens und damit zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“),

25 die dazu führen, dass falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Entsteht als Folge der Mutation ein Stop-Kodon im Kodierbereich, so führt dies ebenfalls zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation. Deletionen von mindestens einem (1) oder mehreren Kodonen

30 führen typischerweise ebenfalls zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität beziehungsweise Funktion.

Für das erfindungsgemäße Verfahren geeignete Stämme sind unter anderem der in der US 5,175,107 beschriebene Stamm BKIIM B-3996, der in der WO 00/09660 beschriebene Stamm

35 KCCM-10132 und Isoleucin bedürftige Mutanten des in der WO

98/04715 beschriebenen Stammes kat-13 geeignet.

Gegebenenfalls können Stämme mit den genannten Maßnahmen, insbesondere durch Einbau eines Stopkodons in das rpoS-Gen, beispielsweise eines amber-Kodons an die Stelle

- 5 entsprechend Position 33 der Aminosäuresequenz des RpoS-Proteins und gleichzeitigem Einbau eines korrespondierenden t-RNA-Suppressors beispielsweise supE an das erfindungsgemäße Verfahren adaptiert werden.

- Für das erfindungsgemäße Verfahren geeignete Stämme können  
10 auch dadurch identifiziert werden, dass man die Nukleotidsequenz des rpoS-Gens in einem L-Threonin ausscheidenden Stamm von Escherichia coli bestimmt. Hierzu wird das rpoS-Gen kloniert oder mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und die Nukleotidsequenz  
15 bestimmt. Enthält das rpoS-Gen ein Stopkodon, so wird in einem zweiten Schritt geprüft, ob er ebenfalls einen korrespondierenden t-RNA-Suppressor enthält. Gegebenenfalls wird der auf diese Weise identifizierte Stamm mit den oben beschriebenen Eigenschaften wie beispielsweise  
20 Überexpression des thrA-Allels, Abschwächung des unter aeroben Kulturbedingungen stattfindenden Threoninabbaus, Einführung einer mindestens partiellen Isoleucin-Bedürftigkeit bewirkenden Mutation in das ilvA-Gen oder Wachstum in Gegenwart von mindestens 5 g/l Threonin oder  
25 mit einer oder mehreren der weiterhin aufgeführten Eigenschaften versehen.

Die genannten Eigenschaften beziehungsweise Merkmale können durch Transformation, Transduktion oder Konjugation in gewünschte Stämme übertragen werden.

- 30 Bei der Methode der Transformation wird isoliertes genetisches Material typischerweise DNA in einen Empfängerstamm eingeführt. Bei Bakterien der Familie Enterobacteriaceae wie z. B. Escherichia coli wird die DNA dazu in vitro in Plasmid- oder Phagen-DNA eingebaut und  
35 diese dann in den Empfängerstamm überführt. Die



entsprechenden Methoden und Arbeitsvorschriften sind im Stand der Technik hinlänglich bekannt und beispielsweise im Handbuch von J. Sambrook (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989) ausführlich beschrieben.

Mit Hilfe der Methode des Gen- bzw. Allelaustauschs unter Verwendung konditional replizierender Plasmide können definierte Mutationen in geeignete Stämme transferiert werden. Bei einer definierten Mutation ist mindestens die Position im Chromosom, vorzugsweise die exakte Position der Veränderung der Nukleobase(n) und die Art der Änderung (Substitution, d.h. Transition oder Transversion, Insertion oder Deletion) bekannt. Gegebenenfalls wird die entsprechende DNA zunächst mit gebräuchlichen Methoden sequenziert. Eine gebräuchliche Methode zur Erzielung eines Gen- bzw. eines Allelaustauschs ist die von Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)) beschriebene, bei der das temperatursensitiv replizierende pSC101-Derivat pMAK705 verwendet wird. Mit dieser Methode können Allele vom Plasmid in das Chromosom überführt werden. In gleicher Weise können chromosomale Allele auf das Plasmid überführt werden. Andere im Stand der Technik beschriebene Methoden wie beispielsweise die von Martinez-Morales et al. (Journal of Bacteriology 181: 7143-7148 (1999)), die von Boyd et al. (Journal of Bacteriology 182: 842-847 (2000)) oder die in der WO 01/77345 beschriebene Methode können gleichfalls benutzt werden.

Diese Methode kann unter anderem eingesetzt werden, um rpoS-Allele, die beispielsweise Stop-Kodons enthalten, Suppressorgene wie beispielsweise supE, abgeschwächte tdh-Allele, die beispielsweise Deletionen enthalten, abgeschwächte ilvA-Allele, thrA-Allele, die für „feed back“ resistente Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I Varianten kodieren, die rhtA23-Mutation, abgeschwächte pck-Allele, abgeschwächte Allele des ytfP-ORF's, abgeschwächte

yjfa-ORF's, abgeschwächte poxB-Allele, abgeschwächte yjgF-ORF's in gewünschte Stämme einzufügen.

Bei der Methode der Transduktion wird ein genetisches Merkmal von einem Donorstamm unter Verwendung eines

- 5 Bacteriophagen in einen Empfängerstamm übertragen. Diese Methode gehört zum Stand der Technik und ist in Lehrbüchern wie beispielsweise dem von E. A. Birge (Bacterial and Bacteriophage Genetics, 4th ed., Springer Verlag, New York, USA, 2000) beschrieben.
- 10 Bei Escherichia coli wird typischerweise der Bacteriophage P1 für die generalisierte Transduktion (generalized transduction) (Lennox, Virology 1, 190-206 (1955) verwendet. Eine Zusammenfassung über die Methode der generalisierten Transduktion gibt der Aufsatz „Generalized
- 15 Transduktion“ von M. Masters, der im Lehrbuch von F. C. Neidhard (Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology, 2nd ed., ASM Press, Washington, DC, USA, 1996) enthalten ist. Praktische Anleitungen sind beispielsweise im Handbuch von J. H. Miller (A Short Course
- 20 In Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 1992) oder dem Handbuch von P. Gerhardt „Manual of Methods for General Bacteriology“ (American Society for Microbiology,
- 25 Washington, DC, USA, 1981) enthalten.

Mit Hilfe der Transduktion lassen sich Resistenz vermittelnde oder andere dominante genetische Eigenschaften wie beispielsweise Antibiotika-Resistenz (zum Beispiel Kanamycin-Resistenz, Chloramphenicol-Resistenz, Rifampicin-

- 30 Resistenz oder Borrelidin-Resistenz), Resistenz gegen Antimetabolite (zum Beispiel  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -Hydroxyvaleriansäure-Resistenz,  $\alpha$ -Methyl-Serin-Resistenz oder Diaminobernsteinsäure-Resistenz), Resistenz gegen Metabolite (zum Beispiel Threonin-Resistenz, Homoserin-
- 35 Resistenz, Glutaminsäure-Resistenz, Methionin-Resistenz,

Lysin-Resistenz oder Asparaginsäure-Resistenz) oder auch die Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung in geeignete Empfängerstämme übertragen.

- Die Methode der Transduktion ist ebenfalls geeignet um
- 5 sogenannte nicht selektierbare genetische Eigenschaften wie beispielsweise Aminosäure-Auxotrophien bzw. Bedürftigkeiten (zum Beispiel Isoleucin-Bedürftigkeit, Methionin-Bedürftigkeit oder m-Diaminopimelinsäure-Bedürftigkeit), Vitamin-Bedürftigkeiten oder Sensitivität gegen
- 10 Antimetabolite (zum Beispiel Fluorobrenztraubensäure-Sensitivität) in Empfängerstämme einzuführen. Hierzu verwendet man E. coli Stämme, die in einem Abstand von ungefähr einer Minute auf dem Chromosom das Transposon Tn10 oder Tn10kan enthalten. Diese Stämme sind unter dem Begriff
- 15 „Singer Kollektion“ oder „Singer/Gross Kollektion“ bekannt (Singer et al., Microbiological Reviews 53, 1-24, 1989). Diese Stämme sind beim E. coli Genetic Stock Center der Universität Yale (New Haven, CT, USA) allgemein verfügbar. Weitere Angaben findet man in dem Aufsatz von M. K. B.
- 20 Berlyn et al. "Linkage Map of Escherichia coli K-12, Edition 9", der im Lehrbuch von F. C. Neidhard (Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology, 2nd ed., ASM Press, Washington, DC, USA, 1996) enthalten ist. In ähnlicher Weise lassen sich nicht direkt selektierbare
- 25 genetische Eigenschaften (zum Beispiel Fluorobrenztraubensäure-Sensitivität, Suppressormutationen) und auch solche, deren Mutationsort nicht bekannt ist, in verschiedene Stämme übertragen. Anleitungen hierzu findet man unter anderem in dem Lehrbuch von J. Scaife et al.
- 30 (Genetics of Bacteria, Academic Press, London, UK, 1985), in dem oben erwähnten Aufsatz von M. Masters und in dem oben erwähnten Handbuch von J. H. Miller. Das mit dem Transposon Tn10 eingeführte Tetrazyklin-Resistenzgen kann gegebenenfalls mit der von Bochner et al. (Journal of
- 35 Bacteriology 143, 926-933 (1980)) beschriebenen Methode wieder entfernt werden.

Bei der Methode Konjugation wird genetisches Material durch Zell-Zell Kontakt von einem Donor in einen Empfänger übertragen. Der konjugative Transfer des F-Faktors (F: feritility) , der konjugative Gentransfer unter Verwendung von Hfr-Stämmen (Hfr: high frequency of recombination) und Stämmen, die einen F'-Faktor (F': F prime) tragen, gehören zu den klassischen Verfahren der Genetik. Zusammenfassende Darstellungen findet man unter anderem in dem Standardwerk von F. C. Neidhard (Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology, 2nd ed., ASM Press, Washington, DC, USA, 1996). Praktische Anleitungen sind beispielsweise im Handbuch von J. H. Miller (A Short Course In Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 1992) oder dem Handbuch von P. Gerhardt „Manual of Methods for General Bacteriology“ (American Society for Microbiology, Washington, DC, USA, 1981) enthalten. F-, F' und Hfr-Stämme sind beim E. coli Genetic Stock Center der Universität Yale (New Haven, CT, USA) allgemein verfügbar.

Die Methode der Konjugation wurde beispielsweise eingesetzt, um die von Thèze und Saint-Girons (Journal of Bacteriology 118, 990-998 (1974)) beschriebene Mutation thrC1010 in den Stamm MG442 (Debabov, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 79, 113-136 (2003) zu transferieren. Im Stand der Technik beispielsweise bei Schmid et al. (Journal of Bacteriology 151, 68-76 (1982)) oder Smith und Parsell (Journal of General Microbiology 87, 129-140 (1975)) und Livshits et al. (In: Conference on Metabolic Bacterial Plasmids. Tartusk University Press, Tallin, Estland (1982), p 132-134 und 144-146) sind konjugative Plasmide beschrieben, die die Fähigkeit zur Saccharoseverwertung tragen. So berichtet Debabov (In: Proceedings of the IVth International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms 1982. Kodansha Ltd, Tokyo, Japan, p 254-258) von der Konstruktion Threonin



produzierender Stämme, in die mit Hilfe der Konjugation die Fähigkeit zur Saccharoseverwertung eingebaut wurde.

**Patentansprüche:**

1. Verfahren zur Herstellung von L-Threonin unter Verwendung von L-Threonin produzierenden Bakterien der Familie Enterobacteriaceae, dadurch gekennzeichnet, dass man
- 5
- a) das Bakterium in mindestens einem ersten Nährmedium inokuliert und kultiviert,
- b) einen Teil der Fermentationsbrühe abtrennt, wobei mehr als 90 Vol.-% des Gesamtvolumens der Fermentationsbrühe im Fermentationsbehälter verbleiben, anschließend
- 10
- c) die verbleibende Fermentationsbrühe mit einem oder mehreren Nährmedien auffüllt, wobei das weitere Nährmedium oder die weiteren Nährmedien mindestens eine Kohlenstoffquelle, mindestens eine Stickstoffquelle und mindestens eine Phosphorquelle enthalten, und die Kultivierung unter Bedingungen die die Bildung von L-Threonin erlauben, fortsetzt,
- 15
- d) die Schritte b) und c) gegebenenfalls mehrfach durchführt, und
- 20
- e) die Konzentration der Kohlenstoffquelle(n) während der Kultivierung gemäß Schritt c) und/oder d) bei maximal 30 g/l eingestellt wird.
- 25 2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Kultivierungsschritt (a) nach dem Satzverfahren (batch) durchgeführt wird.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Kultivierungsschritt (a) nach dem Zulaufverfahren (fed batch) durchgeführt wird, wobei
- 30
- mindestens ein Zusatz-Nährmedium eingesetzt wird.

4. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Fermentationsbrühe zu weniger als 8 Vol.-% abgetrennt wird.
- 5 5. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Fermentationsbrühe zu weniger als 5 Vol.-% abgetrennt wird.
6. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Fermentationsbrühe zu weniger als 2 Vol.-% abgetrennt wird.
- 10 7. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass das gebildete L-Threonin gereinigt wird.
- 15 8. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Kohlenstoffquelle um eine oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse aus Zuckerrüben oder Zuckerrohr, Fruktose, Glukose, Stärkehydrolysat, Cellulosehydrolysat, Arabinose, Maltose, Xylose, Essigsäure, Ethanol und Methanol handelt.
- 20 9. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Stickstoffquelle um eine oder mehrere organische, Stickstoff-haltige Stoffe oder Stoffgemische ausgewählt aus der Gruppe Peptone, Hefeextrakte, Fleischextrakte, Malzextrakte, 25 Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff und/oder um eine oder mehrere der anorganischen Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Ammoniak, Ammonium-haltige Salze und Salze der Salpetersäure handelt.
- 30 10. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei Ammonium-haltigen Salzen und Salzen der Salpetersäure um Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat, Ammoniumnitrat, Kaliumnitrat und Kaliumnatriumnitrat handelt.

11. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Phosphorquelle um Phosphorsäure oder deren Alkali- oder Erdalkalisalze, oder deren Polymere oder der Phytinsäure handelt.
- 5 12. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Alkalisalzen der Phosphorsäure um Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze handelt.
- 10 13. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Bakterien der Familie Enterobacteriaceae um die Art Escherichia coli handelt.
- 15 14. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Bakterium der Familie Enterobacteriaceae mindestens ein thrA-Gen oder Allel enthält, das für eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I kodiert.
- 20 15. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Bakterium der Familie Enterobacteriaceae ein Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und amber, bevorzugt amber im rpoS-Gen und einen t-RNA-Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor, ochre-Suppressor und amber-Suppressor, bevorzugt 25 amber-Suppressor enthält.
16. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Schritte (b) und (c) gemäß (d) 0 bis 100 mal, bevorzugt 2 bis 80 mal, bevorzugt 4 bis 50 mal und besonders bevorzugt 5 bis 30 mal wiederholt werden.
- 30 17. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zeit zwischen vollständigen Abtrennen der Fermentationsbrühe auf mehr als 90 Vol.-% des



Gesamtvolumens und dem vollständigen Auffüllen von Nährmedien auf ca. 100% maximal 5 Stunden, beträgt.

18. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass das vollständige Auffüllen von Nährmedien maximal 2 Stunden beträgt.
19. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in dem zugeführtem Nährmedium oder den zugeführten Nährmedien ein Phosphor zu Kohlenstoffverhältnis (P/C Verhältnis) von maximal 4; von maximal 3; von maximal 2; von maximal 1,5; von maximal 1; von maximal 0,7; von maximal 0,5; maximal 0,48; maximal 0,46; maximal 0,44; maximal 0,42; maximal 0,40; maximal 0,38; maximal 0,36; maximal 0,34; maximal 0,32; maximal 0,30 eingestellt wird.
20. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die entnommene Kulturbrühe mit Sauerstoff oder einem sauerstoffhaltigen Gas versehen wird bis die Konzentration der Kohlenstoffquelle unter 2 g/l; unter 1 g/l; unter 0,5 g/l sinkt.
21. Verfahren gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass das gebildete L-Threonin gereinigt wird.
22. Verfahren gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass man zunächst die Biomasse aus der entnommenen Kultur in Schritt (b) zu mindestens 90% entfernt und anschließend das Wasser zu mindestens 90% entfernt.
23. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Kultur bei maximal 20, 10 oder 5 g/l eingestellt wird.
24. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der

Kohlenstoffquelle während der Kultur bei maximal 5 oder 2 g/l eingestellt wird.

5 25. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Kultur bei maximal 5 g/l eingestellt wird.

10 26. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Kultur bei maximal 2 g/l eingestellt wird.

27. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausbeute des gebildeten L-Threonins, bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle, mindestens 31% beträgt.

15 28. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausbeute des gebildeten L-Threonins, bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle, mindestens 37% beträgt.

20 29. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausbeute des gebildeten L-Threonins, bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle, mindestens 42% beträgt.

25 30. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausbeute des gebildeten L-Threonins, bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle, mindestens 48% beträgt.

30 31. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 5,0 bis mehr als 8,0 g/l pro Std. gebildet wird.

32. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 3,5 bis mehr als 5,0 g/l pro Std. gebildet wird.
- 5 33. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 2,5 bis mehr als 3,5 g/l pro Std. gebildet wird.
- 10 34. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein Zulaufverfahren im Kultivierungsschritt (a) angewandt wird, und dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 2,5 bis 5,0 g/l pro Std. gebildet wird.
- 15 35. Saccharose verwertende Transkonjugante von Escherichia coli K-12 hinterlegt als DSM 16293 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland).
- 20 36. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass man Stämme einsetzt, die mindestens folgende Merkmale aufweisen:
- 25 a) eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I, welche gegebenenfalls überexprimiert vorliegt, und
- b) ein Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und amber, bevorzugt amber im rpoS-Gen und einen t-RNA-Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor, ochre-Suppressor und amber-Suppressor.
- 30 37. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass man Stämme einsetzt, die mindestens folgende Merkmale aufweisen:

- 5
- a) eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I, welche gegebenenfalls überexprimiert vorliegt,
  - b) nicht in der Lage sind unter aeroben Kulturbedingungen Threonin abzubauen,
  - c) eine mindestens partielle Isoleucin-Bedürftigkeit, und
  - d) Wachstum in Gegenwart von mindestens 5 g/l Threonin.

10 38. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass man Stämme einsetzt, die mindestens folgende Merkmale aufweisen:

- 15
- a) eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I, welche gegebenenfalls überexprimiert vorliegt,
  - b) ein Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und amber, bevorzugt amber im rpoS-Gen und einen t-RNA-Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor, ochre-Suppressor und amber-Suppressor,
  - c) nicht in der Lage sind unter aeroben Kulturbedingungen Threonin abzubauen, bevorzugt durch Abschwächung der Threonin-Dehydrogenase,
  - d) eine mindestens partielle Isoleucin-Bedürftigkeit, und
  - e) Wachstum in Gegenwart von mindestens 5 g/l Threonin.

20

25

39. Verfahren gemäß Anspruch 36, 37 oder 38, dadurch gekennzeichnet, dass der eingesetzte Stamm zusätzlich

eines oder mehrere der Merkmale ausgewählt aus der Gruppe

- 39.1 Abschwächung der vom pckA-Gen kodierten Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase,
- 5 39.2 Abschwächung der vom pgi-Gen kodierten Phosphoglucose-Isomerase,
- 39.3 Abschwächung des vom offenen Leserahmens ytfP kodierten YtfP-Genproduktes,
- 39.4 Abschwächung des vom offenen Leserahmen yjfa kodierten Yjfa-Genproduktes,
- 39.5 Abschwächung der vom poxB-Gen kodierten Pruvat-Oxidase,
- 39.6 Abschwächung des vom offenen Leserahmen yjgF kodierten YjgF-Genproduktes,
- 15 39.7 Verstärkung der von den Genen pntA und pntB kodierten Transhydrogenase,
- 39.8 Verstärkung der von dem pps-Gen kodierten Phosphoenolpyruvat-Synthase,
- 39.9 Verstärkung der vom ppc-Gen kodierten Phosphoenolpyruvat-Carboxylase,
- 20 39.10 Verstärkung des vom rseB-Gen kodierten Regulators RseB,
- 39.11 Verstärkung des vom galP-Gen kodierten Galaktose-Proton Symporter's,
- 25 39.12 Fähigkeit Saccharose als Kohlenstoffquelle verwenden zu können,
- 39.13 Verstärkung des vom offenen Leserahmens yedA kodierten YedA-Genproduktes,



- 5 39.14 Wachstum in Gegenwart mindestens 0,1 bis 0,5 mM  
oder mindestens 0,5 bis 1 mM Borrelidin  
(Borrelidinresistenz),
- 10 39.15 Wachstum in Gegenwart von mindestens 2 bis 2,5  
g/l oder mindestens 2,5 bis 3 g/l  
Diaminobernsteinsäure (Diaminobernsteinsäure  
Resistenz),
- 15 39.16 Wachstum in Gegenwart von mindestens 30 bis 40  
mM oder mindestens 40 bis 50 mM  $\alpha$ -Methylserin  
( $\alpha$ -Methylserin Resistenz),
- 20 39.17 Wachstum in Gegenwart von höchstens 30 mM oder  
höchstens 40 mM oder höchstens 50 mM  
Fluorobrenztraubensäure  
(Fluorobrenztraubensäure Sensitivität),
- 25 39.18 Wachstum in Gegenwart von mindestens 210 mM  
oder mindestens 240 mM oder mindestens 270 mM  
oder mindestens 300 mM L-Glutaminsäure  
(Glutaminsäure Resistenz),
- 30 39.19 Eine mindestens partielle Bedürftigkeit für  
Methionin,
- 39.20 Eine mindestens partielle Bedürftigkeit für m-  
Diaminopimelinsäure,
- 39.21 Wachstum in Gegenwart von mindestens 100 mg/l  
Rifampicin (Rifampicin Resistenz),
- 39.22 Wachstum in Gegenwart von mindestens 15 g/l L-  
Lysin (Lysin Resistenz),
- 39.23 Wachstum in Gegenwart von mindestens 15 g/l  
Methionin (Methionin Resistenz),
- 39.24 Wachstum in Gegenwart von mindestens 15 g/l L-  
Asparaginsäure (Asparaginsäure Resistenz), und

39.25 Verstärkung der vom pyc-Gen kodierten Pyruvat-Carboxylase

enthalten.

**Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin unter Verwendung von L-Threonin produzierenden Bakterien der Familie  
5 Enterobacteriaceae.

## SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> Degussa AG

<120> Verfahren zur Herstellung von L-Threonin

10 <130> 030235BT

15 <160> 10

<170> PatentIn version 3.1

20 <210> 1  
 <211> 993  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli

25 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(990)  
 <223> rpoS-Gen

30 <400> 1

35 atg agt cag aat acg ctg aaa gtt cat gat tta aat gaa gat gcg gaa 48  
 Met Ser Gln Asn Thr Leu Lys Val His Asp Leu Asn Glu Asp Ala Glu  
 1 5 10 15

40 ttt gat gag aac gga gtt gag gtt ttt gac gaa aag gcc tta gta gaa 96  
 Phe Asp Glu Asn Gly Val Glu Val Phe Asp Glu Lys Ala Leu Val Glu  
 20 25 30

cag gaa ccc agt gat aac gat ttg gcc gaa gag gaa ctg tta tcg cag 144  
 Gln Glu Pro Ser Asp Asn Asp Leu Ala Glu Glu Glu Leu Leu Ser Gln  
 35 40 45

50 gga gcc aca cag cgt gtg ttg gac gcg act cag ctt tac ctt ggt gag 192  
 Gly Ala Thr Gln Arg Val Leu Asp Ala Thr Gln Leu Tyr Leu Gly Glu  
 50 55 60

att ggt tat tca cca ctg tta acg gcc gaa gaa gaa gtt tat ttt gcg 240  
 Ile Gly Tyr Ser Pro Leu Leu Thr Ala Glu Glu Glu Val Tyr Phe Ala  
 65 70 75 80

55 cgt cgc gca ctg cgt gga gat gtc gcc tct cgc cgc cgg atg atc gag 288  
 Arg Arg Ala Leu Arg Gly Asp Val Ala Ser Arg Arg Arg Met Ile Glu  
 85 90 95

60 agt aac ttg cgt ctg gtg gta aaa att gcc cgc cgt tat ggc aat cgt 336  
 Ser Asn Leu Arg Leu Val Val Lys Ile Ala Arg Arg Tyr Gly Asn Arg  
 100 105 110

ggt ctg gcg ttg ctg gac ctt atc gaa gag ggc aac ctg ggg ctg atc 384  
 Gly Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ile Glu Glu Gly Asn Leu Gly Leu Ile  
 115 120 125

	cgc gcg gta gag aag ttt gac ccg gaa cgt ggt ttc cgc ttc tca aca	432
	Arg Ala Val Glu Lys Phe Asp Pro Glu Arg Gly Phe Arg Phe Ser Thr	
	130 135 140	
5	tac gca acc tgg tgg att cgc cag acg att gaa cgg gcg att atg aac	480
	Tyr Ala Thr Trp Trp Ile Arg Gln Thr Ile Glu Arg Ala Ile Met Asn	
	145 150 155 160	
10	caa acc cgt act att cgt ttg ccg att cac atc gta aag gag ctg aac	528
	Gln Thr Arg Thr Ile Arg Leu Pro Ile His Ile Val Lys Glu Leu Asn	
	165 170 175	
15	gtt tac ctg cga acc gca cgt gag ttg tcc cat aag ctg gac cat gaa	576
	Val Tyr Leu Arg Thr Ala Arg Glu Leu Ser His Lys Leu Asp His Glu	
	180 185 190	
20	cca agt gcg gaa gag atc gca gag caa ctg gat aag cca gtt gat gac	624
	Pro Ser Ala Glu Glu Ile Ala Glu Gln Leu Asp Lys Pro Val Asp Asp	
	195 200 205	
25	gtc agc cgt atg ctt cgt ctt aac gag cgc att acc tcg gta gac acc	672
	Val Ser Arg Met Leu Arg Leu Asn Glu Arg Ile Thr Ser Val Asp Thr	
	210 215 220	
30	ccg ctg ggt ggt gat tcc gaa aaa gcg ttg ctg gac atc ctg gcc gat	720
	Pro Leu Gly Gly Asp Ser Glu Lys Ala Leu Leu Asp Ile Leu Ala Asp	
	225 230 235 240	
35	gaa aaa gag aac ggt ccg gaa gat acc acg caa gat gac gat atg aag	768
	Glu Lys Glu Asn Gly Pro Glu Asp Thr Thr Gln Asp Asp Asp Met Lys	
	245 250 255	
40	cag agc atc gtc aaa tgg ctg ttc gag ctg aac gcc aaa cag cgt gaa	816
	Gln Ser Ile Val Lys Trp Leu Phe Glu Leu Asn Ala Lys Gln Arg Glu	
	260 265 270	
45	gtg ctg gca cgt cga ttc ggt ttg ctg ggg tac gaa gcg gca aca ctg	864
	Val Leu Ala Arg Arg Phe Gly Leu Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Thr Leu	
	275 280 285	
50	gaa gat gta ggt cgt gaa att ggc ctc acc cgt gaa cgt gtt cgc cag	912
	Glu Asp Val Gly Arg Glu Ile Gly Leu Thr Arg Glu Arg Val Arg Gln	
	290 295 300	
55	att cag gtt gaa ggc ctg cgc cgt ttg cgc gaa atc ctg caa acg cag	960
	Ile Gln Val Glu Gly Leu Arg Arg Leu Arg Glu Ile Leu Gln Thr Gln	
	305 310 315 320	
60	ggg ctg aat atc gaa gcg ctg ttc cgc gag taa	993
	Gly Leu Asn Ile Glu Ala Leu Phe Arg Glu	
	325 330	
65	<210> 2	
	<211> 330	
	<212> PRT	
	<213> Escherichia coli	
60	<400> 2	
	Met Ser Gln Asn Thr Leu Lys Val His Asp Leu Asn Glu Asp Ala Glu	
	1 5 10 15	
65	Phe Asp Glu Asn Gly Val Glu Val Phe Asp Glu Lys Ala Leu Val Glu	
	20 25 30	



```
<210> 3
<211> 993
<212> DNA
<213> Escherichia coli
```

<220>  
<221> Allel  
<222> (1)..(990)  
<223> rpoS-Allel

5

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (97)..(99)  
<223> amber-Codon

10

<400> 3  
atgagtcaga atacgctgaa agttcatgat ttaaatagaag atgcggaatt tgatgagaac 60  
ggagttgagg tttttgacga aaaggcctta gtagaatagg aaccagtgta taacgatttg 120  
gccgaagagg aactgttata gcagggagcc acacagcgtg tgttggacgc gactcagctt 180  
taccttggtg agattgggta ttcaccactg ttaacggccg aagaagaagt ttattttgcg 240  
cgtcgcgcac tgcgtggaga tgcgcctct cgccgccgga tgatcgagag taacttgctg 300  
ctggtggtaa aaattgcccg ccgttatggc aatcgtggtc tggcgttgct ggaccttata 360  
gaagagggca acctggggct gatccgcgcg gtagagaagt ttgacctgga acgtgggttc 420  
cgcttctcaa catacgcaac ctggtggatt cgccagacga ttgaacgggc gattatgaac 480  
caaaccgta ctattcggtt gccgattcac atcgtaaagg agctgaacgt ttacctgcga 540  
accgcacgtg agttgtccca taagctggac catgaaccaa gtgcggaaga gatcgagag 600  
caactggata agccagttga tgacgtcagc cgtatgcttc gtcttaacga gcgcattacc 660  
tcggtagaca ccccgctggg tgggtgattcc gaaaaagcgt tgctggacat cctggccgat 720  
gaaaaagaga acggtccgga agataccacg caagatgacg atatgaagca gagcatcgtc 780  
aatggctgt tcgagctgaa cgccaaacag cgtgaagtgc tggcacgtcg attcggtttg 840  
ctggggtacg aagcggcaac actggaagat gtaggtcgtg aaattggcct caccctgtaa 900  
cgtgttcgcc agattcaggt tgaaggcctg cgccgtttgc gcgaaatcct gcaaacgcag 960  
gggctgaata tcgaagcgct gttccgcgag taa 993

<210> 4  
<211> 75  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli

50

<220>  
<221> tRNA  
<222> (1)..(75)  
<223> supE-Allel

55

<400> 4  
tgggggtatcg ccaagcggta aggcaccgga ttctaattcc ggcattccga gggttcgaatc 60  
ctcgtacccc agcca 75

60

<210> 5  
 <211> 1545  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli

5

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1542)  
 <223> ilvA-Gen

10

<400> 5

15

atg gct gac tcg caa ccc ctg tcc ggt gct ccg gaa ggt gcc gaa tat 48  
 Met Ala Asp Ser Gln Pro Leu Ser Gly Ala Pro Glu Gly Ala Glu Tyr  
 1 5 10 15

tta aga gca gtg ctg cgc gcg ccg gtt tac gag gcg gcg cag gtt acg 96  
 Leu Arg Ala Val Leu Arg Ala Pro Val Tyr Glu Ala Ala Gln Val Thr  
 20 25 30

20

ccg cta caa aaa atg gaa aaa ctg tcg tcg cgt ctt gat aac gtc att 144  
 Pro Leu Gln Lys Met Glu Lys Leu Ser Ser Arg Leu Asp Asn Val Ile  
 35 40 45

25

ctg gtg aag cgc gaa gat cgc cag cca gtg cac agc ttt aag ctg cgc 192  
 Leu Val Lys Arg Glu Asp Arg Gln Pro Val His Ser Phe Lys Leu Arg  
 50 55 60

30

ggc gca tac gcc atg atg gcg ggc ctg acg gaa gaa cag aaa gcg cac 240  
 Gly Ala Tyr Ala Met Met Ala Gly Leu Thr Glu Glu Gln Lys Ala His  
 65 70 75 80

35

ggc gtg atc act gct tct gcg ggt aac cac gcg cag ggc gtc gcg ttt 288  
 Gly Val Ile Thr Ala Ser Ala Gly Asn His Ala Gln Gly Val Ala Phe  
 85 90 95

40

tct tct gcg cgg tta ggc gtg aag gcc ctg atc gtt atg cca acc gcc 336  
 Ser Ser Ala Arg Leu Gly Val Lys Ala Leu Ile Val Met Pro Thr Ala  
 100 105 110

acc gcc gac atc aaa gtc gac gcg gtg cgc ggc ttc ggc ggc gaa gtg 384  
 Thr Ala Asp Ile Lys Val Asp Ala Val Arg Gly Phe Gly Gly Glu Val  
 115 120 125

45

ctg ctc cac ggc gcg aac ttt gat gaa gcg aaa gcc aaa gcg atc gaa 432  
 Leu Leu His Gly Ala Asn Phe Asp Glu Ala Lys Ala Lys Ala Ile Glu  
 130 135 140

50

ctg tca cag cag cag ggg ttc acc tgg gtg ccg ccg ttc gac cat ccg 480  
 Leu Ser Gln Gln Gln Gly Phe Thr Trp Val Pro Pro Phe Asp His Pro  
 145 150 155 160

55

atg gtg att gcc ggg caa ggc acg ctg gcg ctg gaa ctg ctc cag cag 528  
 Met Val Ile Ala Gly Gln Gly Thr Leu Ala Leu Glu Leu Leu Gln Gln  
 165 170 175

60

gac gcc cat ctc gac cgc gta ttt gtg cca gtc ggc ggc ggc ggt ctg 576  
 Asp Ala His Leu Asp Arg Val Phe Val Pro Val Gly Gly Gly Gly Leu  
 180 185 190

gct gct ggc gtg gcg gtg ctg atc aaa caa ctg atg ccg caa atc aaa 624  
 Ala Ala Gly Val Ala Val Leu Ile Lys Gln Leu Met Pro Gln Ile Lys  
 195 200 205

	gtg atc gcc gta gaa gcg gaa gac tcc gcc tgc ctg aaa gca gcg ctg Val Ile Ala Val Glu Ala Glu Asp Ser Ala Cys Leu Lys Ala Ala Leu 210 215 220	672
5	gat gcg ggt cat ccg gtt gat ctg ccg cgc gta ggg cta ttt gct gaa Asp Ala Gly His Pro Val Asp Leu Pro Arg Val Gly Leu Phe Ala Glu 225 230 235 240	720
10	ggc gta gcg gta aaa cgc atc ggt gac gaa acc ttc cgt tta tgc cag Gly Val Ala Val Lys Arg Ile Gly Asp Glu Thr Phe Arg Leu Cys Gln 245 250 255	768
15	gag tat ctc gac gac atc atc acc gtc gat agc gat gcg atc tgt gcg Glu Tyr Leu Asp Asp Ile Ile Thr Val Asp Ser Asp Ala Ile Cys Ala 260 265 270	816
20	gcg atg aag gat tta ttc gaa gat gtg cgc gcg gtg gcg gaa ccc tct Ala Met Lys Asp Leu Phe Glu Asp Val Arg Ala Val Ala Glu Pro Ser 275 280 285	864
	ggc gcg ctg gcg ctg gcg gga atg aaa aaa tat atc gcc ctg cac aac Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Met Lys Lys Tyr Ile Ala Leu His Asn 290 295 300	912
25	att cgc ggc gaa cgg ctg gcg cat att ctt tcc ggt gcc aac gtg aac Ile Arg Gly Glu Arg Leu Ala His Ile Leu Ser Gly Ala Asn Val Asn 305 310 315 320	960
30	ttc cac ggc ctg cgc tac gtc tca gaa cgc tgc gaa ctg ggc gaa cag Phe His Gly Leu Arg Tyr Val Ser Glu Arg Cys Glu Leu Gly Glu Gln 325 330 335	1008
35	cgt gaa gcg ttg ttg gcg gtg acc att ccg gaa gaa aaa ggc agc ttc Arg Glu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ile Pro Glu Glu Lys Gly Ser Phe 340 345 350	1056
40	ctc aaa ttc tgc caa ctg ctt ggc ggg cgt tcg gtc acc gag ttc aac Leu Lys Phe Cys Gln Leu Leu Gly Gly Arg Ser Val Thr Glu Phe Asn 355 360 365	1104
	tac cgt ttt gcc gat gcc aaa aac gcc tgc atc ttt gtc ggt gtg cgc Tyr Arg Phe Ala Asp Ala Lys Asn Ala Cys Ile Phe Val Gly Val Arg 370 375 380	1152
45	ctg agc cgc ggc ctc gaa gag cgc aaa gaa att ttg cag atg ctc aac Leu Ser Arg Gly Leu Glu Glu Arg Lys Glu Ile Leu Gln Met Leu Asn 385 390 395 400	1200
50	gac ggc ggc tac agc gtg gtt gat ctc tcc gac gac gaa atg gcg aag Asp Gly Gly Tyr Ser Val Val Asp Leu Ser Asp Asp Glu Met Ala Lys 405 410 415	1248
55	cta cac gtg cgc tat atg gtc ggc gga cgt cca tcg cat ccg ttg cag Leu His Val Arg Tyr Met Val Gly Gly Arg Pro Ser His Pro Leu Gln 420 425 430	1296
60	gaa cgc ctc tac agc ttc gaa ttc ccg gaa tca ccg ggc gcg ctg ctg Glu Arg Leu Tyr Ser Phe Glu Phe Pro Glu Ser Pro Gly Ala Leu Leu 435 440 445	1344
	cgc ttc ctc aac acg ctg ggt acg tac tgg aac att tct ttg ttc cac Arg Phe Leu Asn Thr Leu Gly Thr Tyr Trp Asn Ile Ser Leu Phe His 450 455 460	1392

	tat cgc agc cat ggc acc gac tac ggg cgc gta ctg gcg gcg ttc gaa	1440
	Tyr Arg Ser His Gly Thr Asp Tyr Gly Arg Val Leu Ala Ala Phe Glu	
	465 470 475 480	
5	ctt ggc gac cat gaa ccg gat ttc gaa acc cgg ctg aat gag ctg ggc	1488
	Leu Gly Asp His Glu Pro Asp Phe Glu Thr Arg Leu Asn Glu Leu Gly	
	485 490 495	
10	tac gat tgc cac gac gaa acc aat aac ccg gcg ttc agg ttc ttt ttg	1536
	Tyr Asp Cys His Asp Glu Thr Asn Asn Pro Ala Phe Arg Phe Phe Leu	
	500 505 510	
15	gcg ggt tag	1545
	Ala Gly	
20	<210> 6	
	<211> 514	
	<212> PRT	
	<213> Escherichia coli	
25	<400> 6	
	Met Ala Asp Ser Gln Pro Leu Ser Gly Ala Pro Glu Gly Ala Glu Tyr	
	1 5 10 15	
	Leu Arg Ala Val Leu Arg Ala Pro Val Tyr Glu Ala Ala Gln Val Thr	
	20 25 30	
30	Pro Leu Gln Lys Met Glu Lys Leu Ser Ser Arg Leu Asp Asn Val Ile	
	35 40 45	
35	Leu Val Lys Arg Glu Asp Arg Gln Pro Val His Ser Phe Lys Leu Arg	
	50 55 60	
	Gly Ala Tyr Ala Met Met Ala Gly Leu Thr Glu Glu Gln Lys Ala His	
	65 70 75 80	
40	Gly Val Ile Thr Ala Ser Ala Gly Asn His Ala Gln Gly Val Ala Phe	
	85 90 95	
45	Ser Ser Ala Arg Leu Gly Val Lys Ala Leu Ile Val Met Pro Thr Ala	
	100 105 110	
	Thr Ala Asp Ile Lys Val Asp Ala Val Arg Gly Phe Gly Gly Glu Val	
	115 120 125	
50	Leu Leu His Gly Ala Asn Phe Asp Glu Ala Lys Ala Lys Ala Ile Glu	
	130 135 140	
	Leu Ser Gln Gln Gln Gly Phe Thr Trp Val Pro Pro Phe Asp His Pro	
	145 150 155 160	
55	Met Val Ile Ala Gly Gln Gly Thr Leu Ala Leu Glu Leu Leu Gln Gln	
	165 170 175	
	Asp Ala His Leu Asp Arg Val Phe Val Pro Val Gly Gly Gly Gly Leu	
	180 185 190	
60	Ala Ala Gly Val Ala Val Leu Ile Lys Gln Leu Met Pro Gln Ile Lys	
	195 200 205	
65	Val Ile Ala Val Glu Ala Glu Asp Ser Ala Cys Leu Lys Ala Ala Leu	
	210 215 220	



	Asp	Ala	Gly	His	Pro	Val	Asp	Leu	Pro	Arg	Val	Gly	Leu	Phe	Ala	Glu
	225					230					235					240
5	Gly	Val	Ala	Val	Lys	Arg	Ile	Gly	Asp	Glu	Thr	Phe	Arg	Leu	Cys	Gln
					245					250					255	
	Glu	Tyr	Leu	Asp	Asp	Ile	Ile	Thr	Val	Asp	Ser	Asp	Ala	Ile	Cys	Ala
				260					265					270		
10	Ala	Met	Lys	Asp	Leu	Phe	Glu	Asp	Val	Arg	Ala	Val	Ala	Glu	Pro	Ser
			275					280					285			
	Gly	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Gly	Met	Lys	Lys	Tyr	Ile	Ala	Leu	His	Asn
15		290					295					300				
	Ile	Arg	Gly	Glu	Arg	Leu	Ala	His	Ile	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn	Val	Asn
	305					310					315					320
	Phe	His	Gly	Leu	Arg	Tyr	Val	Ser	Glu	Arg	Cys	Glu	Leu	Gly	Glu	Gln
20					325					330					335	
	Arg	Glu	Ala	Leu	Leu	Ala	Val	Thr	Ile	Pro	Glu	Glu	Lys	Gly	Ser	Phe
				340					345					350		
25	Leu	Lys	Phe	Cys	Gln	Leu	Leu	Gly	Gly	Arg	Ser	Val	Thr	Glu	Phe	Asn
			355					360					365			
	Tyr	Arg	Phe	Ala	Asp	Ala	Lys	Asn	Ala	Cys	Ile	Phe	Val	Gly	Val	Arg
30		370					375					380				
	Leu	Ser	Arg	Gly	Leu	Glu	Glu	Arg	Lys	Glu	Ile	Leu	Gln	Met	Leu	Asn
	385					390					395					400
	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ser	Val	Val	Asp	Leu	Ser	Asp	Asp	Glu	Met	Ala	Lys
35					405					410					415	
	Leu	His	Val	Arg	Tyr	Met	Val	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	His	Pro	Leu	Gln
				420					425					430		
40	Glu	Arg	Leu	Tyr	Ser	Phe	Glu	Phe	Pro	Glu	Ser	Pro	Gly	Ala	Leu	Leu
			435					440					445			
	Arg	Phe	Leu	Asn	Thr	Leu	Gly	Thr	Tyr	Trp	Asn	Ile	Ser	Leu	Phe	His
45		450					455					460				
	Tyr	Arg	Ser	His	Gly	Thr	Asp	Tyr	Gly	Arg	Val	Leu	Ala	Ala	Phe	Glu
	465					470					475					480
	Leu	Gly	Asp	His	Glu	Pro	Asp	Phe	Glu	Thr	Arg	Leu	Asn	Glu	Leu	Gly
50					485					490					495	
	Tyr	Asp	Cys	His	Asp	Glu	Thr	Asn	Asn	Pro	Ala	Phe	Arg	Phe	Phe	Leu
				500					505					510		
55	Ala	Gly														

<210> 7  
 <211> 1545  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1542)  
 <223> ilvA-Allel

5

<220>  
 <221> mutation  
 <222> (856)..(856)  
 <223>

10

<400> 7

15

atg gct gac tcg caa ccc ctg tcc ggt gct ccg gaa ggt gcc gaa tat 48  
 Met Ala Asp Ser Gln Pro Leu Ser Gly Ala Pro Glu Gly Ala Glu Tyr  
 1 5 10 15

20

tta aga gca gtg ctg cgc gcg ccg gtt tac gag gcg gcg cag gtt acg 96  
 Leu Arg Ala Val Leu Arg Ala Pro Val Tyr Glu Ala Ala Gln Val Thr  
 20 25 30

25

ccg cta caa aaa atg gaa aaa ctg tcg tcg cgt ctt gat aac gtc att 144  
 Pro Leu Gln Lys Met Glu Lys Leu Ser Ser Arg Leu Asp Asn Val Ile  
 35 40 45

30

ctg gtg aag cgc gaa gat cgc cag cca gtg cac agc ttt aag ctg cgc 192  
 Leu Val Lys Arg Glu Asp Arg Gln Pro Val His Ser Phe Lys Leu Arg  
 50 55 60

35

ggc gca tac gcc atg atg gcg ggc ctg acg gaa gaa cag aaa gcg cac 240  
 Gly Ala Tyr Ala Met Met Ala Gly Leu Thr Glu Glu Gln Lys Ala His  
 65 70 75 80

40

ggc gtg atc act gct tct gcg ggt aac cac gcg cag ggc gtc gcg ttt 288  
 Gly Val Ile Thr Ala Ser Ala Gly Asn His Ala Gln Gly Val Ala Phe  
 85 90 95

45

tct tct gcg cgg tta ggc gtg aag gcc ctg atc gtt atg cca acc gcc 336  
 Ser Ser Ala Arg Leu Gly Val Lys Ala Leu Ile Val Met Pro Thr Ala  
 100 105 110

50

acc gcc gac atc aaa gtc gac gcg gtg cgc ggc ttc ggc ggc gaa gtg 384  
 Thr Ala Asp Ile Lys Val Asp Ala Val Arg Gly Phe Gly Gly Glu Val  
 115 120 125

55

ctg ctc cac ggc gcg aac ttt gat gaa gcg aaa gcc aaa gcg atc gaa 432  
 Leu Leu His Gly Ala Asn Phe Asp Glu Ala Lys Ala Lys Ala Ile Glu  
 130 135 140

60

ctg tca cag cag cag ggg ttc acc tgg gtg ccg ccg ttc gac cat ccg 480  
 Leu Ser Gln Gln Gln Gly Phe Thr Trp Val Pro Pro Phe Asp His Pro  
 145 150 155 160

65

atg gtg att gcc ggg caa ggc acg ctg gcg ctg gaa ctg ctc cag cag 528  
 Met Val Ile Ala Gly Gln Gly Thr Leu Ala Leu Glu Leu Leu Gln Gln  
 165 170 175

gac gcc cat ctc gac cgc gta ttt gtg cca gtc ggc ggc ggc ggt ctg 576  
 Asp Ala His Leu Asp Arg Val Phe Val Pro Val Gly Gly Gly Gly Leu  
 180 185 190

gct gct ggc gtg gcg gtg ctg atc aaa caa ctg atg ccg caa atc aaa 624  
 Ala Ala Gly Val Ala Val Leu Ile Lys Gln Leu Met Pro Gln Ile Lys  
 195 200 205

	gtg atc gcc gta gaa gcg gaa gac tcc gcc tgc ctg aaa gca gcg ctg Val Ile Ala Val Glu Ala Glu Asp Ser Ala Cys Leu Lys Ala Ala Leu 210 215 220	672
5	gat gcg ggt cat ccg gtt gat ctg ccg cgc gta ggg cta ttt gct gaa Asp Ala Gly His Pro Val Asp Leu Pro Arg Val Gly Leu Phe Ala Glu 225 230 235 240	720
10	ggc gta gcg gta aaa cgc atc ggt gac gaa acc ttc cgt tta tgc cag Gly Val Ala Val Lys Arg Ile Gly Asp Glu Thr Phe Arg Leu Cys Gln 245 250 255	768
15	gag tat ctc gac gac atc atc acc gtc gat agc gat gcg atc tgt gcg Glu Tyr Leu Asp Asp Ile Ile Thr Val Asp Ser Asp Ala Ile Cys Ala 260 265 270	816
20	gcg atg aag gat tta ttc gaa gat gtg cgc gcg gtg gcg aaa ccc tct Ala Met Lys Asp Leu Phe Glu Asp Val Arg Ala Val Ala Lys Pro Ser 275 280 285	864
25	ggc gcg ctg gcg ctg gcg gga atg aaa aaa tat atc gcc ctg cac aac Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Met Lys Lys Tyr Ile Ala Leu His Asn 290 295 300	912
30	att cgc gcc gaa cgg ctg gcg cat att ctt tcc ggt gcc aac gtg aac Ile Arg Gly Glu Arg Leu Ala His Ile Leu Ser Gly Ala Asn Val Asn 305 310 315 320	960
35	ttc cac gcc ctg cgc tac gtc tca gaa cgc tgc gaa ctg gcc gaa cag Phe His Gly Leu Arg Tyr Val Ser Glu Arg Cys Glu Leu Gly Glu Gln 325 330 335	1008
40	cgt gaa gcg ttg ttg gcg gtg acc att ccg gaa gaa aaa gcc agc ttc Arg Glu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ile Pro Glu Glu Lys Gly Ser Phe 340 345 350	1056
45	ctc aaa ttc tgc caa ctg ctt gcc ggg cgt tgc gtc acc gag ttc aac Leu Lys Phe Cys Gln Leu Leu Gly Gly Arg Ser Val Thr Glu Phe Asn 355 360 365	1104
50	tac cgt ttt gcc gat gcc aaa aac gcc tgc atc ttt gtc ggt gtg cgc Tyr Arg Phe Ala Asp Ala Lys Asn Ala Cys Ile Phe Val Gly Val Arg 370 375 380	1152
55	ctg agc cgc gcc ctc gaa gag cgc aaa gaa att ttg cag atg ctc aac Leu Ser Arg Gly Leu Glu Glu Arg Lys Glu Ile Leu Gln Met Leu Asn 385 390 395 400	1200
60	gac gcc gcc tac agc gtg gtt gat ctc tcc gac gac gaa atg gcg aag Asp Gly Gly Tyr Ser Val Val Asp Leu Ser Asp Asp Glu Met Ala Lys 405 410 415	1248
	cta cac gtg cgc tat atg gtc gcc gga cgt cca tgc cat ccg ttg cag Leu His Val Arg Tyr Met Val Gly Gly Arg Pro Ser His Pro Leu Gln 420 425 430	1296
	gaa cgc ctc tac agc ttc gaa ttc ccg gaa tca ccg gcc gcg ctg ctg Glu Arg Leu Tyr Ser Phe Glu Phe Pro Glu Ser Pro Gly Ala Leu Leu 435 440 445	1344
	cgc ttc ctc aac acg ctg ggt acg tac tgg aac att tct ttg ttc cac Arg Phe Leu Asn Thr Leu Gly Thr Tyr Trp Asn Ile Ser Leu Phe His 450 455 460	1392

	tat cgc agc cat ggc acc gac tac ggg cgc gta ctg gcg gcg ttc gaa	1440
	Tyr Arg Ser His Gly Thr Asp Tyr Gly Arg Val Leu Ala Ala Phe Glu	
	465 470 475 480	
5	ctt ggc gac cat gaa ccg gat ttc gaa acc cgg ctg aat gag ctg ggc	1488
	Leu Gly Asp His Glu Pro Asp Phe Glu Thr Arg Leu Asn Glu Leu Gly	
	485 490 495	
10	tac gat tgc cac gac gaa acc aat aac ccg gcg ttc agg ttc ttt ttg	1536
	Tyr Asp Cys His Asp Glu Thr Asn Asn Pro Ala Phe Arg Phe Phe Leu	
	500 505 510	
15	gcg ggt tag	1545
	Ala Gly	
20	<210> 8	
	<211> 514	
	<212> PRT	
	<213> Escherichia coli	
25	<400> 8	
	Met Ala Asp Ser Gln Pro Leu Ser Gly Ala Pro Glu Gly Ala Glu Tyr	
	1 5 10 15	
	Leu Arg Ala Val Leu Arg Ala Pro Val Tyr Glu Ala Ala Gln Val Thr	
	20 25 30	
30	Pro Leu Gln Lys Met Glu Lys Leu Ser Ser Arg Leu Asp Asn Val Ile	
	35 40 45	
35	Leu Val Lys Arg Glu Asp Arg Gln Pro Val His Ser Phe Lys Leu Arg	
	50 55 60	
	Gly Ala Tyr Ala Met Met Ala Gly Leu Thr Glu Glu Gln Lys Ala His	
	65 70 75 80	
40	Gly Val Ile Thr Ala Ser Ala Gly Asn His Ala Gln Gly Val Ala Phe	
	85 90 95	
45	Ser Ser Ala Arg Leu Gly Val Lys Ala Leu Ile Val Met Pro Thr Ala	
	100 105 110	
	Thr Ala Asp Ile Lys Val Asp Ala Val Arg Gly Phe Gly Gly Glu Val	
	115 120 125	
50	Leu Leu His Gly Ala Asn Phe Asp Glu Ala Lys Ala Lys Ala Ile Glu	
	130 135 140	
	Leu Ser Gln Gln Gln Gly Phe Thr Trp Val Pro Pro Phe Asp His Pro	
	145 150 155 160	
55	Met Val Ile Ala Gly Gln Gly Thr Leu Ala Leu Glu Leu Leu Gln Gln	
	165 170 175	
	Asp Ala His Leu Asp Arg Val Phe Val Pro Val Gly Gly Gly Gly Leu	
	180 185 190	
60	Ala Ala Gly Val Ala Val Leu Ile Lys Gln Leu Met Pro Gln Ile Lys	
	195 200 205	
65	Val Ile Ala Val Glu Ala Glu Asp Ser Ala Cys Leu Lys Ala Ala Leu	
	210 215 220	

[illegible]



<220>  
 <221> DNA  
 <222> (1)..(1548)  
 <223>

5

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (527)..(952)  
 <223> yjgF-Orf

10

<400> 9

15

tcgcgatctg gtactgtaag gggaaataga gatgacacac gataataaat tgcagggttga 60

agctattaaa cgcggcacgg taattgacca tatccccgcc cagatcggtt ttaagctggt 120

gagtctgttc aagctgaccg aaacggatca gcgcatacc attggtctga acctgccttc 180

20

tggcgagatg ggccgcaaag atctgatcaa aatcgaaaat acctttttga gtgaagatca 240

agtagatcaa ctggcattgt atgcgccgca agccacgggt aaccgtatcg acaactatga 300

25

agtgggtgggt aaatcgcgcc caagtctgcc ggagcgcata gacaatgtgc tggctctgccc 360

gaacagcaac tgtatcagcc atgcogaacc ggtttcatcc agctttgccg tgcgaaaacg 420

cgccaatgat atcgcgctca aatgcaaata ctgtgaaaaa gagttttccc ataatgtggt 480

30

gctggccaat taattgcggt tggtaataaa agtctggctc cctata atg agc cag 535  
 Met Ser Gln  
 1

35

act ttt tac cgc tgt aat aaa gga gaa atc atg agc aaa act atc gcg 583  
 Thr Phe Tyr Arg Cys Asn Lys Gly Glu Ile Met Ser Lys Thr Ile Ala  
 5 10 15

40

acg gaa aat gca ccg gca gct atc ggt cct tac gta cag ggc gtt gat 631  
 Thr Glu Asn Ala Pro Ala Ala Ile Gly Pro Tyr Val Gln Gly Val Asp  
 20 25 30 35

45

ctg ggc aat atg atc atc acc tcc ggt cag atc ccg gta aat ccg aaa 679  
 Leu Gly Asn Met Ile Ile Thr Ser Gly Gln Ile Pro Val Asn Pro Lys  
 40 45 50

acg ggc gaa gta ccg gca gac gtc gct gca cag gca cgt cag tcg ctg 727  
 Thr Gly Glu Val Pro Ala Asp Val Ala Gln Ala Arg Gln Ser Leu  
 55 60 65

50

gat aac gta aaa gcg atc gtc gaa gcc gct ggc ctg aaa gtg ggc gac 775  
 Asp Asn Val Lys Ala Ile Val Glu Ala Ala Gly Leu Lys Val Gly Asp  
 70 75 80

55

atc gtt aaa act acc gtg ttt gta aaa gat ctg aac gac ttc gca acc 823  
 Ile Val Lys Thr Thr Val Phe Val Lys Asp Leu Asn Asp Phe Ala Thr  
 85 90 95

60

gta aac gcc act tac gaa gcc ttc ttc acc gaa cac aac gcc acc ttc 871  
 Val Asn Ala Thr Tyr Glu Ala Phe Phe Thr Glu His Asn Ala Thr Phe  
 100 105 110 115

65

ccg gca cgt tct tgc gtt gaa gtt gcc cgt ctg ccg aaa gac gtg aag 919  
 Pro Ala Arg Ser Cys Val Glu Val Ala Arg Leu Pro Lys Asp Val Lys  
 120 125 130

att gag atc gaa gcg atc gct gtt cgt cgc taa tcttgatgga aatccgggct 972  
 Ile Glu Ile Glu Ala Ile Ala Val Arg Arg  
                   135                  140

5 atcatgcccg gattaagtct gatgacaaac gcaaaatcgc ctgatgcgct acgcttatca 1032  
 ggcctacgtg attcctgcaa tttattgaat ttgttggccg gataaggcat ttacgccgca 1092  
 10 tccggcatga acaaaactca ctttgtctac aatctgaatc ggggctatcg tgcccagttt 1152  
 attctttatt gccagccgta acgacggcta tagaaccctt tcaccaactg ggttaatgtc 1212  
 atataccctg ccagaatcgc aaccagccac gggaaatagc ttaacggcag cgcctgtaat 1272  
 15 tgcagataac tggccagcgg tgaaaacggc aatgogatcc cgacaatcat cacgatcacg 1332  
 gtcatgatca ttaacggcca cgatgcacag ctctgaataa acggcacacg gcgggtgcgg 1392  
 atcatatgca caatcagcgt ttgcgacagt aagcccacca caaacatcc cgactggaac 1452  
 20 agcgtttgcg tttccggcgt gttggcatgg aatacccacc acatcaggca aaacgtcaaa 1512  
 atatcgaaga tcgagctgat cgggccgaag aagatc 1548

25 <210> 10  
 <211> 141  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli  
 30

<400> 10  
 Met Ser Gln Thr Phe Tyr Arg Cys Asn Lys Gly Glu Ile Met Ser Lys  
 1                  5                  10                  15  
 35 Thr Ile Ala Thr Glu Asn Ala Pro Ala Ala Ile Gly Pro Tyr Val Gln  
                   20                  25                  30  
 40 Gly Val Asp Leu Gly Asn Met Ile Ile Thr Ser Gly Gln Ile Pro Val  
                   35                  40                  45  
 Asn Pro Lys Thr Gly Glu Val Pro Ala Asp Val Ala Ala Gln Ala Arg  
                   50                  55                  60  
 45 Gln Ser Leu Asp Asn Val Lys Ala Ile Val Glu Ala Ala Gly Leu Lys  
                   65                  70                  75                  80  
 Val Gly Asp Ile Val Lys Thr Thr Val Phe Val Lys Asp Leu Asn Asp  
                   85                  90                  95  
 50 Phe Ala Thr Val Asn Ala Thr Tyr Glu Ala Phe Phe Thr Glu His Asn  
                   100                  105                  110  
 55 Ala Thr Phe Pro Ala Arg Ser Cys Val Glu Val Ala Arg Leu Pro Lys  
                   115                  120                  125  
 Asp Val Lys Ile Glu Ile Glu Ala Ile Ala Val Arg Arg  
                   130                  135                  140

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY-SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**